

THESE

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR EN BIOLOGIE

Mention Biodiversité-Ecologie-Environnement

Evolution de la résistance au bactério-insecticide *Bti* chez les moustiques.

Présentée par **Margot Paris**

Soutenance publique le 1^{er} Février 2010 devant le jury composé de :

Christine Chevillon	Chargée de recherche au CNRS, Montpellier - Rapporteur
Xavier Vekemans	Professeur, Université Lille 1 - Rapporteur
Pierre Capy	Professeur, Université Paris 11 - Examineur
Rémi Foussadier	Directeur de l'Entente Interdépartementale pour la Démoustication Rhône-Alpes - Examineur
Laurence Després	Professeure, Université de Grenoble - Directrice de thèse
Jean-Philippe David	Chargé de recherche au CNRS, Grenoble, Co-directeur de thèse

Thèse préparée au sein du

Laboratoire d'Ecologie Alpine

UMR UJF-CNRS 5553 BP 53 Université Joseph Fourier 38041 GRENOBLE CEDEX 09

Je remercie de tout mon cœur les personnes qui m'ont entouré ces quatre dernières années !!!!

Bien sur, chacun de vous aura droit à de plus amples remerciements en privé ;)



Rhône-Alpes Région



Table des matières

Liste de publications :	5
INTRODUCTION	7
I- Traitements et résistance aux insecticides chez les moustiques.....	7
<i>I.1- La résistance aux pesticides, un modèle d'adaptation rapide</i>	7
<i>I.2- Mécanismes de résistance aux pesticides</i>	8
<i>I.3- Traitements insecticides et résistances chez les moustiques</i>	9
<i>I.3.1- Biologie et cycle de vie des moustiques</i>	9
<i>I.3.2- Les moustiques, vecteurs de maladies</i>	11
<i>I.3.3- Insecticides chimiques et résistances chez les moustiques</i>	11
II- <i>Bacillus thuringiensis (Bt)</i>	14
<i>II.1- Description</i>	14
<i>II.2- Bacillus thuringiensis, un insecticide « propre »</i>	15
<i>II.3- Les toxines du Bt</i>	16
<i>II.3.1- Diversité de toxines produites par Bacillus thuringiensis</i>	16
<i>II.3.2- Les toxines Cry</i>	17
<i>II.3.3- Les toxines cytolytiques Cyt</i>	21
<i>II.4- Complexité des mélanges et interactions de synergisme entre les toxines</i>	21
<i>II.5- La résistance aux toxines de Bacillus thuringiensis</i>	22
<i>II.5.1- Mécanismes de résistance</i>	22
<i>II.5.2- Résistances croisées entre toxines</i>	24
<i>II.6- Rémanence du Bti dans l'environnement et toxicité des litières végétales dans la région Rhône-Alpes</i>	24
III- Facteurs influençant l'apparition et l'évolution de la résistance aux pesticides.....	26
<i>III.1- Les facteurs biologiques</i>	26
<i>III.2- Les facteurs génétiques</i>	27
<i>III.3- Les facteurs opérationnels</i>	29
<i>III.3.1- Autres pressions de sélection : historique et écologie des gîtes larvaires</i>	29
<i>III.3.2- Stratégies de gestion de la résistance</i>	30
IV- Obtenir et mesurer la résistance des moustiques au <i>Bti</i>	32
<i>IV.1- Mesurer les taux de résistance</i>	32
<i>IV.2- Des souches de Bti recombinantes pour l'étude de la résistance aux toxines individuelles</i>	32
<i>IV.3- Espèces modèles et sélection au laboratoire</i>	33

IV.4- Résistance au Bti chez les espèces de terrain.....	34
V- Rechercher les bases génétiques de la résistance au Bti.....	36
V.1- Les quatre forces évolutives impliquées dans l'adaptation	36
V.2- Les méthodes utilisées pour détecter la sélection dans les génomes.....	37
V.2.1- Transcriptomique comparative.....	37
V.2.2- Méthodes génétiques.....	38
V.3- Les marqueurs moléculaires pour les scans génomiques	40
V.4- Séquençage des loci outliers AFLP	43
V.4.1- Séquençage par réduction des profils AFLP et isolation sur gel	43
V.4.2- Le séquençage haut débit.....	44
VI- Le coût de la résistance	46
VI.1- Origine des coûts.....	46
VI.2- Estimation du coût de la résistance	47
VI.3- Variation du coût de la résistance selon l'environnement	48
VI.4- Mécanismes de compensation du coût de la résistance.....	48
VI.5- Les études du coût de la résistance aux insecticides.....	50
VII- Les flux de gènes chez les populations de moustiques.....	51
VII.1- Observations directes.....	51
VII.2- Observations indirectes grâce à la génétique des populations.....	51
VIII- Objectifs de la thèse et modèles biologiques utilisés	53
VIII.1- Objectifs et stratégies adoptées	53
VIII.2- Modèles biologiques utilisés	54
VIII.2.1- Litières toxiques (objectifs 1 et 2).....	54
VIII.2.2- <i>Aedes aegypti</i> (objectifs 2, 3 et 4).....	55
VIII.2.3- <i>Aedes rusticus</i> (objectif 5)	56
 CHAPITRE 1- Origine et rémanence du Bti dans l'environnement en Rhône-Alpes.....	 57
I- Présentation de l'étude et principaux résultats	57
II- Contribution scientifique sous forme d'article.....	58
 CHAPITRE 2- Apparition et évolution de la résistance au Bti proliférant dans les litières végétales : sélection artificielle d'une souche d'<i>Aedes aegypti</i> au laboratoire	 71
I- Présentation de l'étude et principaux résultats	71
II- Contribution sous forme d'article	72

CHAPITRE 3- Recherche des bases moléculaires de la résistance aux toxines du <i>Bti</i>	93
I- Scan génomique à l'aide de marqueurs AFLP	93
<i>I.1- Génotypage des marqueurs AFLP</i>	93
<i>I.2- Différenciation génétique entre les deux souches analysées</i>	94
<i>I.3- Détection des loci AFLP outliers.....</i>	96
<i>I.4- Séquençage des loci outliers</i>	96
<i>I.4.1- Validation de la méthode</i>	97
<i>I.4.2- Analyse des données de séquençage.....</i>	97
<i>I.4.3- Séquençage des loci outliers identifiés chez la souche résistante LiTOX.....</i>	101
<i>I.5- Localisation des loci outliers et recherche de gènes candidats à proximité.....</i>	103
<i>I.2- Contribution sous forme d'article</i>	105
II- Scan génomique avec des marqueurs DArT liés à un élément transposable.....	121
<i>II.1- Présentation de l'étude et principaux résultats.....</i>	121
<i>II.2- Contribution sous forme d'article</i>	124
III- Comparaison de l'expression des gènes entre les souches résistante et sensible aux toxines du <i>Bti</i>	187
<i>III.1- Analyse comparative de l'expression des enzymes de détoxification</i>	187
<i>III.1.1- Mesure de l'expression des gènes codant pour des enzymes de détoxification.....</i>	187
<i>III.1.2- Résultats et interprétation</i>	189
<i>III.2- Analyse comparative de l'ensemble du transcriptome des souches sensible et résistante grâce au séquençage à très haut débit.....</i>	190
<i>III.2.1- Séquençage du transcriptome</i>	190
<i>III.2.2- Analyse des résultats.....</i>	191
<i>III.2.3- Résultats et interprétation</i>	192
 CHAPITRE 4- Coût de la résistance au toxines du <i>Bti</i>	 197
I- Présentation de l'étude et principaux résultats	197
II- Contribution scientifique sous forme d'article.....	198
 CHAPITRE 5- Génomique des populations du moustique <i>Aedes rusticus</i> traité depuis plus de 15 ans dans la région Rhône-Alpes.....	 221
I- Présentation de l'étude et principaux résultats	221
II- Contribution scientifique sous forme d'article.....	223

Discussion globale et perspectives.....	239
I- La rémanence du <i>Bti</i> dans l'environnement	239
<i>I.1- Impact du Bti commercial sur les écosystèmes.....</i>	<i>239</i>
<i>I.2- Impact de la rémanence du Bti sur la résistance des larves de moustique.....</i>	<i>240</i>
<i>I.3- Quels sont les facteurs environnementaux à l'origine de cette rémanence ?</i>	<i>241</i>
<i>I.4- Composition des litières toxiques</i>	<i>241</i>
II- Quel modèle biologique pour l'étude de la résistance au <i>Bti</i> ?	242
III- La résistance aux toxines du <i>Bti</i>	243
<i>III.1- Apparition rapide d'une résistance aux toxines Cry.....</i>	<i>243</i>
<i>III.2- Mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance au Bti chez la souche LiTOX</i>	<i>244</i>
<i>III.3- Résistance croisée entre les toxines du Bti.....</i>	<i>245</i>
<i>III.4- Coûts et compromis adaptatifs</i>	<i>245</i>
IV- Etude des bases génétiques de la résistance au <i>Bti</i> par scans génomiques	246
<i>IV.1- Détection et localisation dans le génome des signatures de sélection positive détectées par scans génomiques</i>	<i>247</i>
<i>IV.2- Origine des signatures de sélection détectées par les scans génomiques.....</i>	<i>248</i>
<i>IV.3- Identification de gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux toxines du Bti</i>	<i>250</i>
<i>IV.4- Séquençage des gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux toxines du Bti</i>	<i>251</i>
V- Transcriptomique et recherche des bases génétiques de la résistance au <i>Bti</i>	253
VI- Conclusion générale.....	254
Bibliographie.....	255

Liste de publications :

Article 1 : TILQUIN M, PARIS M, REYNAUD S, DESPRES L, RAVANEL P, GEREMIA RA, GURY G (2008). Long-lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* sp. *israelensis* (*Bti*) in mosquito natural habitats. *PLoS ONE* 3(10): e3432.

Article 2 : PARIS M, TETREAU G, LAURENT F, LELU M, DESPRES L, DAVID JP. *Bti* persistence in environment induces resistance to multiple *Bti* toxins. *Pest Managment Science*, sous presse.

Article 3: PARIS M, BONNES B, FICETOLA GF, PONCET B, DESPRES L. (2010). Amplified fragment length homoplasmy: *in silico* analysis for model and non-model species. *BMC Genomics*, 11:287.

Article 4 : BONIN A, PARIS M, DESPRES L, TETREAU G, DAVID JP, KILIAN A (2008). A MITE-based genotyping method to reveal hundreds of DNA polymorphisms in an animal organism after a few generations of artificial selection. *BMC Genomics*, 9:459.

Article 5 : BONIN A, PARIS M, TETREAU G, DAVID JP, DESPRES L (2009). Candidate genes revealed by a genome scan for mosquito resistance to a bacterial insecticide: sequence and gene expression variation. *BMC Genomics*, 10:551.

Article 6 : PARIS M, DAVID JP, DESPRES L. Resistance cost to *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* toxins in the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. En préparation.

Article 7 : PARIS M, BOYER S, BONIN A, COLLADO A, DAVID JP, DESPRES L. (2010). Genome scan in the mosquito *Aedes rusticus*: population structure and detection of positive selection after insecticide treatment. *Molecular Ecology*, 19, 325:337.

INTRODUCTION

I- Traitements et résistance aux insecticides chez les moustiques

I.1- La résistance aux pesticides, un modèle d'adaptation rapide

La résistance aux pesticides pose de nombreux problèmes en production agricole ou en santé publique car la résistance de certains insectes peut avoir comme conséquence indirecte une recrudescence des maladies dont ils sont vecteurs. Outre les aspects pratiques, d'un point de vue fondamental, les résistances aux pesticides offrent aux chercheurs la possibilité de travailler sur des **exemples d'adaptations rapides aux perturbations d'origine anthropique** entraînant des changements drastiques de l'environnement. Leur étude permet de mieux comprendre comment de tels processus adaptatifs apparaissent et évoluent au sein des populations sur des pas de temps très courts au regard du temps évolutif.

La résistance est une caractéristique héritable d'une espèce, permettant de survivre et de se reproduire, à des doses de pesticide létales pour la plupart des individus de type sensible de cette espèce. Les résistances aux pesticides sont apparues très rapidement après les premières utilisations d'insecticide (Lindquist & Wilson 1948) ou d'herbicide (Ryan 1970). Chez les moustiques, l'apparition de résistance au DDT est apparue en Floride (USA) seulement un an après les premières utilisations de ce produit en démoustication en 1946 (Hemingway & Ranson 2000).

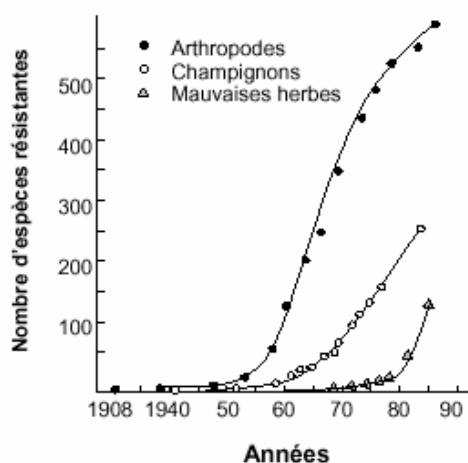


Figure 1 : Evolution du nombre d'espèces d'arthropodes, de champignons et d'adventices résistantes dans le monde (Holt & Le Baron 1990).

La progression des résistances touche la plupart des familles de pesticides et couvre l'ensemble des espèces cibles exposées régulièrement aux pesticides (figure 1, Holt & Le Baron 1990). Il est intéressant de souligner également que la majorité de ces résistances se trouve concentrée dans les pays développés, là où l'utilisation des pesticides est intensive.

1.2- Mécanismes de résistance aux pesticides

Les pesticides sont classés en différentes familles de molécules chimiques, chaque famille possédant un mode d'action propre chez les espèces qu'elle contrôle. Les changements adaptatifs liés à la résistance aux pesticides sont très étudiés et connus pour de nombreuses familles de molécules. Ils font intervenir plusieurs mécanismes : des mutations dans la séquence du gène codant pour la cible et l'élévation des processus de détoxification sont les deux mécanismes majeurs à l'origine de la résistance aux pesticides (Scott 1999, Brogdon & McAllister 1998, Ffrench-Constant et al. 2004,).

La résistance peut résulter de mutations ponctuelles dans le gène codant pour la(es) protéine(s)-cible(s) de l'insecticide. Dans ce cas, la résistance résulte de la **modification de la cible de l'insecticide** (Ffrench-Constant et al. 2004). Une seule mutation non synonyme dans le gène peut ainsi conférer une résistance en modifiant la structure tertiaire de la protéine, réduisant ainsi l'affinité de la molécule pesticide pour son site de fixation. Dans de nombreux cas de résistance, le site de la mutation conférant la résistance à une famille d'insecticides est conservé chez un grand nombre d'espèces non-apparentées (Ffrench-Constant et al. 1998, Ffrench-Constant et al. 2004). Par exemple, le même acide aminé est substitué dans l'acétylcholinestérase d'individus résistants aux carbamates ou aux organophosphorés chez différents genres de moustiques (*Anopheles* et *Culex*, Weill et al 2003). L'apparition récurrente de la même mutation de façon indépendante peut être expliquée par la nécessité biologique de maintenir la fonction d'origine de la protéine ; un nombre limité de substitutions d'acides aminés peut alors être toléré.

La résistance peut également être associée à des **mécanismes métaboliques** impliqués dans la dégradation, l'inactivation et/ou l'excrétion des pesticides. Ce type de résistance implique généralement des mutations dans des grands groupes enzymatiques non-spécifiques tels que les carboxylestérases, les monooxygénases à cytochrome P450 (P450s) et les glutathion *S*-transférases (GST) (Scott 1999, Ranson & Hemingway 2005). L'une de leur

fonction est de séquestrer des composés exogènes ou de les transformer en composés plus hydrophiles et donc moins toxiques et plus facilement éliminés par excrétion. Les mécanismes génétiques responsables de la résistance métabolique font intervenir soit 1/ des mutations non synonymes dans la séquence codante du gène entraînant une modification de la structure de l'enzyme lui conférant une activité et/ou une affinité accrue pour le substrat, 2/ une duplication du gène, 3/ une amplification du gène codant pour l'enzyme résultant en une surproduction d'ARNm et donc de protéines, 4/ une modification de la régulation du gène au niveau de la transcription en ARN, ou au niveau de la traduction résultant en une surproduction de protéines (Taylor & Feyereisen 1996, Raymond et al. 1998). Cette résistance métabolique n'étant pas liée au mode d'action des pesticides, elle peut rendre un individu résistant simultanément à plusieurs familles de pesticides si les molécules présentent un même radical chimique reconnu par les enzymes de détoxification impliquées (Powles et al. 1997, Brogdon & McAllister 1998, Preston 2004). On parle alors de « résistance croisée ».

D'autres mécanismes permettant d'éviter le contact avec la molécule pesticide (résistance comportementale), de réduire sa pénétration, son transport à l'intérieur de l'organisme, ou de la séquestrer peuvent également être impliqués dans la résistance (Oakeshott 2003, Yu et al. 2004). Etant des mécanismes peu fréquents et parfois difficiles à mettre en évidence, ils sont peu étudiés dans le cas de la résistance aux pesticides.

1.3- Traitements insecticides et résistances chez les moustiques

1.3.1- Biologie et cycle de vie des moustiques

Les moustiques sont des insectes de l'ordre des Diptères et de la famille des Culicidés. Plus des 2500 espèces de moustiques sont décrites à ce jour, réparties en plus de 40 genres. Leur aire de répartition est très vaste et concerne toutes les régions climatiques.

Le cycle de vie des moustiques se compose de stades aquatiques (larves et nymphes) et d'un stade aérien pour les adultes (figure 2). La femelle gravide pond en général **ses œufs** directement sur l'eau ou sur les bordures humides des gîtes larvaires. Les œufs des moustiques du genre *Aedes* peuvent survivre en absence d'eau, leur permettant une résistance à la sécheresse. La longévité des œufs est variable suivant les espèces : elle est assez courte (quelques mois) pour les espèces tropicales ayant de nombreuses générations par an et peut

être de plusieurs années pour les espèces annuelles des régions tempérées. Après l'éclosion des œufs, **quatre stades larvaires** se succèdent, séparés chacun par une mue. La durée du stade larvaire varie beaucoup en fonction des espèces. Par exemple, le stade larvaire de l'espèce hivernale des régions tempérées *Aedes rusticus* peut durer plusieurs mois, tandis qu'il peut être seulement de quelques jours chez *Aedes aegypti* en milieu tropical. La larve se transforme ensuite **en nymphe** (ou pupa) à l'intérieur de laquelle le moustique adulte se métamorphose. Le stade nymphal est également aquatique et de durée variable (souvent 1 à 3 jours) pendant lesquels le moustique ne se nourrit pas.

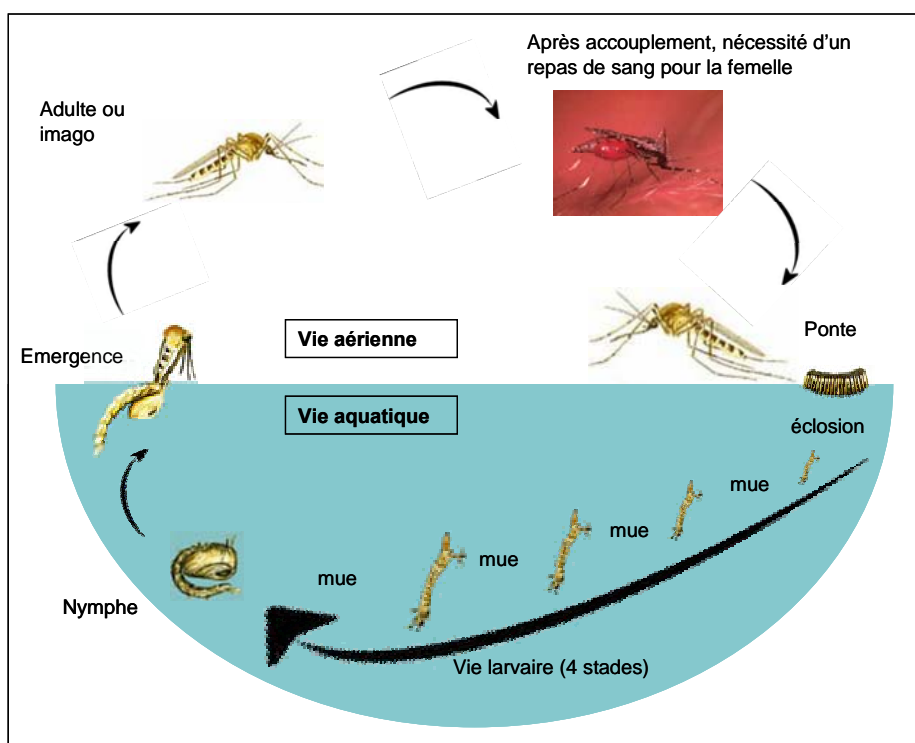


Figure 2 : Cycle de vie des Culicidés.

L'adulte, une fois métamorphosé, provoque une cassure au niveau de la tête nymphale et émerge à la surface de l'eau. Les moustiques, comme beaucoup d'insectes, se nourrissent de pollen et de nectar, et ont de ce fait un rôle comme pollinisateurs dans les écosystèmes. Seules les femelles sont hématophages ; elles n'ont pas besoin de sang pour leur propre survie, mais en retirent les protéines nécessaires à la maturation de leurs œufs. L'accouplement s'effectue quelques jours après l'émergence des adultes et les spermatozoïdes sont stockés par les femelles jusqu'à la ponte des œufs. C'est une fois fécondées que les femelles vont effectuer un repas de sang en piquant principalement des humains ou d'autres

vertébrés. La fécondation des œufs se produit lors de la ponte, puis les embryons deviennent matures dans les œufs avant l'éclosion.

I.3.2- Les moustiques, vecteurs de maladies

En France, les moustiques posent surtout des problèmes de **nuisance** et peuvent avoir un impact économique négatif sur le tourisme par exemple. Les moustiques posent également des **problèmes sanitaires** car ils sont vecteurs de nombreuses maladies : certains moustiques du genre *Anopheles* transmettent la malaria, tandis que certains *Aedes* la dengue ou le chikungunya, et certains *Culex* la filiarose, le West Nile virus ou l'encéphalite (Hemingway & Ranson 2000). La malaria est causée par un parasite protozoaire du genre *Plasmodium* et est une des maladies les plus répandue au monde. Chaque année, environ 500 millions de personnes sont infectées et entre 1 et 3 millions en meurt, dont plus de 80 % en Afrique (WHO 2005). En France et en Europe, des programmes de modifications des paysages ont abouti à l'éradication de la malaria dans les années 50 (Sérandour et al. 2007). Nos régions représentent tout de même un fort réservoir de vecteurs potentiels, avec par exemple plus de 38 espèces de moustiques présentes en Rhône-Alpes (Entente Interdépartementale pour la Démoustication, communication personnelle). D'ailleurs, certain virus comme le virus du Nil occidental, sont régulièrement observés en Europe (Hubalek & Halouzka 1999, Autorino et al. 2002). Récemment, l'augmentation des échanges économiques et humains a favorisé la dispersion de certaines espèces (Benedict et al. 2007). De plus, les changements climatiques globaux peuvent favoriser l'augmentation des aires de répartition des moustiques et entraîner une émergence des maladies qu'ils transmettent (Patz et al. 1996, Gould & Higgs 2009). Enfin, certaines espèces de moustiques invasives ont la particularité de coloniser rapidement de nombreuses régions du globe, augmentant ainsi l'aire de répartition des maladies qu'ils transmettent. C'est le cas du moustique asiatique *Aedes albopictus* qui, à partir de l'Asie, a colonisé l'Amérique, l'Afrique et l'Europe depuis les années 1990 (Dalla & Majori 1992, Benedict et al. 2007), et qui a causé en 2007 une épidémie de chikungunya en Italie (Rezza et al 2007, Enserink 2007).

I.3.3- Insecticides chimiques et résistances chez les moustiques

Comme aucun vaccin n'est disponible pour la plupart des maladies transmises par les moustiques, la lutte contre les vecteurs de ces maladies représente un enjeu majeur de santé

publique (WHO 2006). L'utilisation du DDT en 1946, a d'abord laissé espérer une éradication des vecteurs de la malaria en Afrique. Cet espoir s'est avéré vain car les premiers cas de résistance au DDT sont apparus dès 1947 (Hemingway & Ranson 2000). Depuis, quatre principales familles d'**insecticides chimiques** ont été utilisées pour la démoustication : les organochlorés (surtout représentés par le DDT), les organophosphorés, les carbamates et les pyréthrinoïdes. Ces quatre familles d'insecticides ciblent directement le système nerveux central des insectes, ce qui rend leur action très efficace. Ils agissent principalement sur deux cibles du système nerveux en empêchant la transmission de l'influx nerveux : soit en inhibant l'acétylcholinestérase (organophosphorés et carbamates), soit en bloquant l'activité des canaux sodium (organochlorés et pyréthrinoïdes).

Depuis le début de leur utilisation, plus d'une centaine d'espèces de moustique ont développé **des résistances à ces insecticides** (Hemingway & Ranson 2000). Les mécanismes de ces résistances sont très étudiés et sont connus pour certaines espèces de moustiques (Brogdon & McAllister 1998, Hemingway & Ranson 2000, Hemingway et al. 2004, Nauen 2007). Tout d'abord, l'amplification de mécanismes de détoxications peut être impliquée dans la résistance à toutes ces familles d'insecticides (Figure 3). Ensuite des modifications au niveau des deux cibles de ces insecticides sont décrites (Figure 3) : elles impliquent soit une mutation dans les canaux sodiums (mutation kdr pour 'knockdown résistance'), soit des mutations au niveau de l'acétylcholinestérase (MACE pour 'modified acetylcholinesterase').












	Biochemical mechanism of resistance				
	Metabolic			Target-site	
	Esterases	Monoxygenases	GSH S-Transferases	kdr	MACE
Pyrethroids					
DDT					
Carbamates					
Organophosphates					

Figure 3 : Mécanismes majeurs de résistance aux principales classes d'insecticides chimiques connus chez les moustiques. Les mécanismes majeurs sont représentés par de larges cercles, alors que les mécanismes plus mineurs sont représentés par de plus petits cercles (Nauen 2007).

Depuis la récente mise en application de la directive européenne sur les produits biocides, les principaux insecticides chimiques considérés comme trop polluants ont été retirés du marché ou vont se voir interdits d'utilisation. Depuis septembre 2006, **l'insecticide d'origine bactérienne *Bacillus thuringiensis israelensis* (Bti)** devient pratiquement la seule substance active autorisée pour le traitement des gîtes larvaires à moustiques en milieu naturel en France métropolitaine.

En résumé : Soumises aux fortes pressions de sélection exercées par les pesticides, les espèces se sont rapidement adaptées en développant des résistances. Chez les moustiques, des résistances à toutes les familles d'insecticides chimiques sont connues et étudiées. Elles impliquent principalement deux grands mécanismes : l'élévation des activités de détoxification ou la mutation de la cible de l'insecticide.

II- *Bacillus thuringiensis* (Bt)

II.1- Description

Bacillus thuringiensis (figure 4) est une bactérie Gram-positive, anaérobie ou aérobie facultative que l'on retrouve dans de nombreux environnements (Schnepf et al. 1998). Ces bactéries font partie du groupe des *Bacillus cereus* qui comprend notamment *Bacillus anthracis* provoquant l'anthrax. Les bactéries *Bacillus thuringiensis* (Bt) ont la particularité de produire lors de la sporulation une inclusion parasporale constituée d'un cristal protéique ayant une forte activité entomopathogène (Angus 1954). Ce cristal protéique peut contenir plusieurs toxines différentes et montrer des formes variées suivant sa composition en toxines (bipyramidale, cubique, ronde,...).

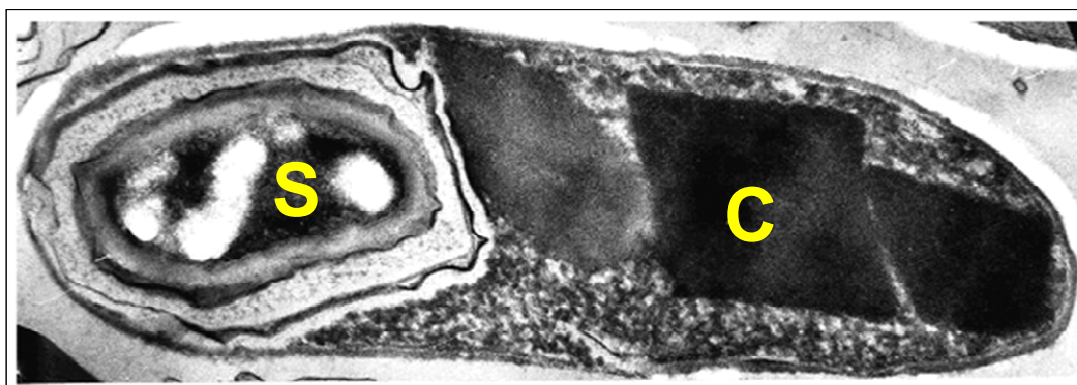


Figure 4 : La bactérie *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* contenant une spore (S) et des cristaux protéiques (C). http://microgen.ouhsc.edu/b_thuring/btk_pic.png.

Les spores de *Bt* et les cristaux protéiques doivent être ingérés par les larves d'insectes sensibles, dissouts et activés par des protéases du tube digestif pour exprimer leur toxicité. Les toxines activées se fixent ensuite sur des récepteurs membranaires spécifiques et forment des pores dans les membranes des cellules épithéliales du tube digestif. La formation de pores dans les cellules permet la pénétration et la germination des spores de *Bt* ainsi que la prolifération de cellules bactériennes végétatives dans l'hémocèle, provoquant une septicémie chez l'insecte hôte et participant à sa mort.

D'abord découverte au début du 20^{ème} siècle au Japon puis en Allemagne, *Bacillus thuringiensis* a rapidement été considéré comme un agent de contrôle très prometteur dans la lutte contre les Lépidoptères (Angus 1954, Heimpel & Angus 1960, Beegle & Yamamoto

1992). Depuis, de nombreuses souches ont été décrites et isolées à travers le monde, principalement à partir de cadavres d'insectes dans lesquelles elles proliféraient. La majorité de ces bactéries montrent une activité toxique contre les hôtes dans lesquelles elles ont été isolées, cette spécificité a permis la découverte d'une grande diversité de toxines entomopathogènes. Les bactéries *Bt* sont également fréquemment présentes (sous forme de spores principalement) dans les sols, les gîtes à moustiques, les débris végétaux ou sur la surface des feuilles (Martin & travers 1989, Sun et al. 1996, Hansen et al. 1998, Jensen et al. 2003).

En 1978, la sous-espèce *Bacillus thuringiensis israelensis* (ou *Bti*) montrant une forte toxicité contre les Diptères et particulièrement contre les **larves de moustiques** a été décrite (de Barjac 1978). Le *Bti* a la particularité de produire un cristal protéique contenant **6 toxines différentes en mélange**, toutes toxiques contre les Diptères : Cry4A, Cry4B, Cry11A, Cry10, Cyt1A et Cyt2A. Dans la lutte contre les moustiques, les bactério-insecticides (*Bacillus thuringiensis* et *Bacillus sphaericus*) sont devenus en 2006 les seuls insecticides larvicides autorisés en France métropolitaine.

II.2- *Bacillus thuringiensis*, un insecticide « propre »

Depuis les 50 dernières années, beaucoup d'études ont été menées afin d'évaluer l'impact des traitements au Bt sur les espèces non cibles et sur l'environnement (Lacey & Siegel 2000, Kumar et al. 2008). Le principal avantage du Bt par rapport aux insecticides chimiques est sa très **forte spécificité pour son hôte cible**. Cette forte spécificité est due au mode d'action des toxines du *Bt* qui se fixent à des récepteurs membranaires du tube digestif très différenciés entre les espèces. Ces toxines ne montrant aucune affinité pour les récepteurs d'autres organismes, aucune toxicité n'a été démontrée pour la plupart des insectes et invertébrés non-cibles du Bt (Thomas & Ellar 1983, Charbonneau et al. 1994, Hershey et al. 1995), les vertébrés (WHO 1982, Lacey & siegel 2000), et les mammifères (Thomas & Ellar 1983, McClintock et al. 1995) dont les humains (Green et al. 1990). En ce qui concerne la démoustication, la pulvérisation de toxines de *Bti* dans les gîtes larvaires de moustiques représente aujourd'hui **une alternative « propre »** aux insecticides chimiques (Regis et al. 2001, Lacey 2007).

Plusieurs études ont également démontré l'absence d'impacts négatifs des traitements bactério-insecticides sur la biomasse microbienne des sols (bactéries et champignons, Ferreira

et al. 2003, Muchaonyerwa et al. 2004). Cependant, l'impact précis de ces traitements sur la structure et la dynamique des communautés microbiennes des sols reste encore à évaluer.

II.3- Les toxines du Bt

II.3.1- Diversité de toxines produites par Bacillus thuringiensis

Les bactéries *Bacillus thuringiensis* produisent une **grande variété de protéines** (Agaisse & Dereclus 1995, Crickmore et al. 1998, de Maagd et al. 2001). Plus de 475 protéines différentes sont répertoriées sur les bases de données disponibles sur le site internet http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/ (Crickmore et al. 2009). La plupart des gènes qui codent pour ces toxines sont connus. Chaque toxine n'est produite que par un seul gène porté par un des plasmides de la bactérie. La remarquable diversité de toxines est principalement attribuée à la forte plasticité génétique des plasmides qui contiennent les gènes codant pour les toxines (Schnepf et al. 1998) ainsi qu'aux nombreuses transmissions de plasmides par conjugaison entre souches ou entre espèces de *Bt* (Gonzalez et al. 1982, Thomas et al. 2001).

Chaque toxine agit de façon spécifique sur un nombre restreint d'hôtes, cependant, l'ensemble de ces toxines présente une toxicité pour un grand nombre d'ordres d'insectes : Lépidoptères (papillons, mites), Coléoptères (scarabées, charançons), Diptères (moustiques, mouches) ou Hyménoptères (guêpes, abeilles). Une minorité de toxines présente également une toxicité pour d'autres organismes comme par exemple les nématodes (Huffman et al. 2004, Griffiths et al. 2005). Deux familles de toxines sont produites par les bactéries *Bt* : **les toxines Cry** caractéristiques des *Bacillus thuringiensis*, et les **toxines Cyt** présentes chez seulement un nombre restreint de sous-espèces de *Bt* (environ une dizaine connues, Crickmore et al. 2009), dont la sous-espèce *israelensis* utilisée pour la démoustication. A l'intérieur de chaque famille, les toxines sont classifiées en fonction de leurs homologies de séquence protéique. Trois rangs sont principalement utilisés pour classifier les toxines (de Maagd et al. 2001) :

- le premier, représenté par un chiffre, permet de différencier les toxines possédant moins de 45 % d'identité de séquence protéique (Cry1, Cry4, Cry11,...)
- le deuxième, représenté par une lettre majuscule, permet de différencier les toxines possédant de 45 à 78 % d'identité de séquence protéique (Cry4A, Cry4B,...)

- le troisième représenté par une lettre minuscule, permet de différencier les toxines possédant de 78 à 95 % d'identité de séquence protéique (Cry4Aa, Cry4Ab,...).

Un arbre phylogénétique entre les différentes toxines Cry est représenté dans la figure 5.

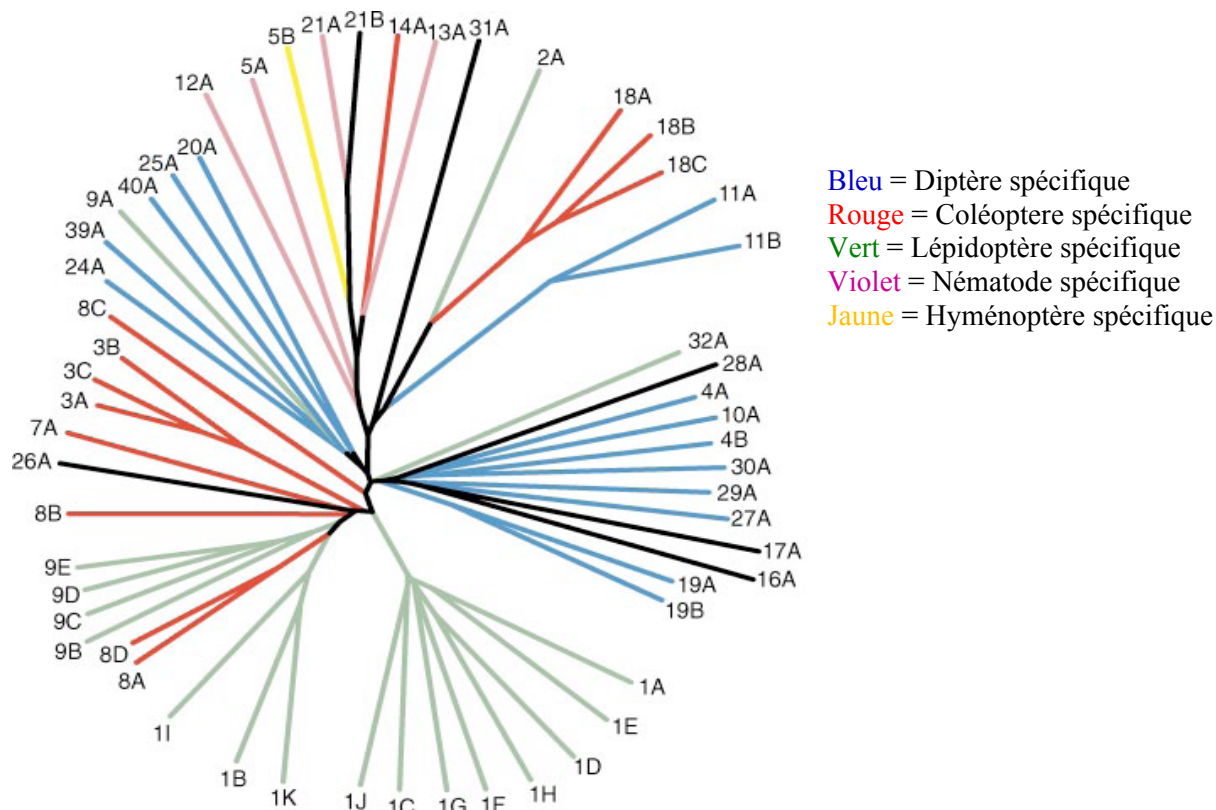


Figure 5 : Arbre phylogénétique entre différentes toxines Cry.

II.3.2- Les toxines Cry

Les protéines de la famille Cry sont composées de **3 principaux groupes structuraux** homologues caractéristiques de leur toxicité (Shnepf et al. 1998, de Maagd et al. 2001) : les domaines I, II et III (Figure 6b). Les domaines II et III sont constitués de trois et deux feuillets bêta respectivement et sont principalement impliqués dans la reconnaissance et la fixation spécifique aux récepteurs membranaires. Situé à l'extrémité N-terminale de la protéine, le domaine I est composé de 7 hélices alpha et est impliqué dans la formation du pore membranaire permettant la toxicité de la toxine. Les protoxines inactives possèdent une extension en C-terminale, plus ou moins longue suivant les toxines (Figure 6a). Un clivage de ces extensions par des protéases du tube digestif des insectes permet l'activation des toxines.

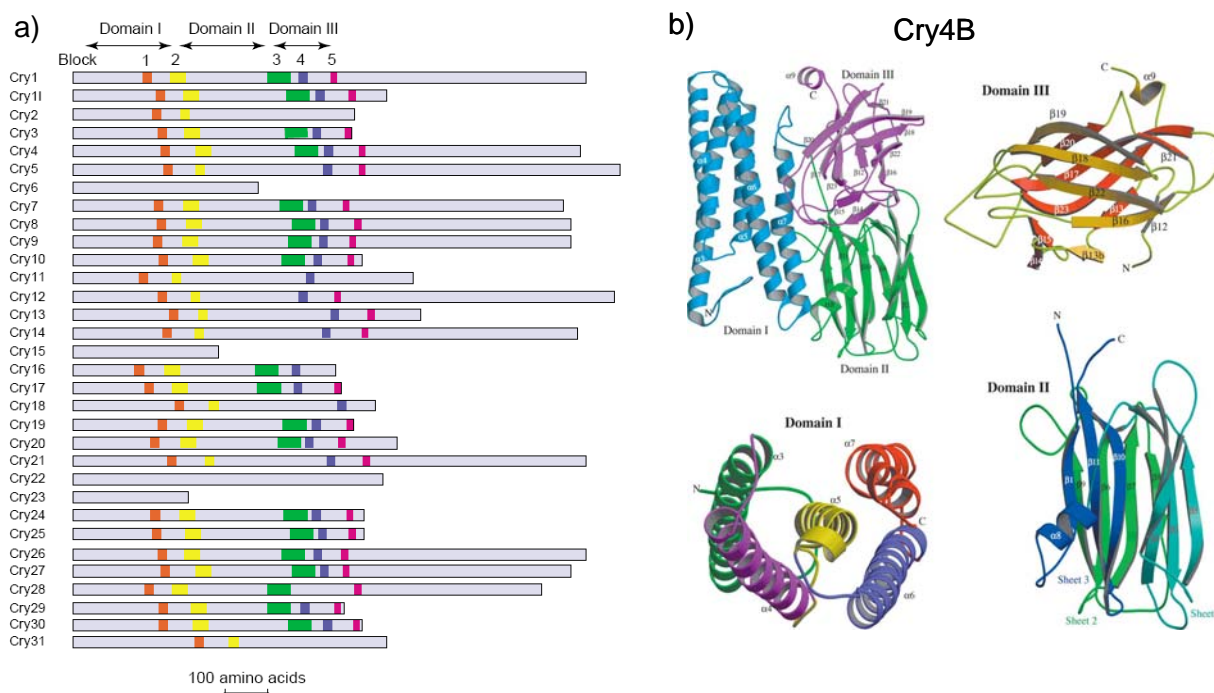


Figure 6 : a) Structure primaire, position de cinq blocs conservés et taille relative des différents domaines des protoxines Cry (de Maagd et al. 2001). b) Structure tridimensionnelle de la toxine Cry4B ainsi que de ses trois sous-domaines structuraux.

Le mode d'action exact des toxines Cry chez les moustiques est encore peu connu. Il existe cependant beaucoup de données chez les Lépidoptères et les Coléoptères, notamment chez les ravageurs des cultures transgéniques qui expriment des gènes codant pour des toxines Cry (Ferre & Van Rie 2002, Griffit & Aroian 2005, Bravo et al. 2007). Comme toutes les toxines Cry possèdent une structure tridimensionnelle similaire, les mécanismes d'action sont probablement conservés entre ces toxines même si elles ont des cibles biologiques différentes (De Maagd et al. 2001, Bravo et al. 2007).

Après avoir été ingéré, le cristal protéique est tout d'abord solubilisé dans le tube digestif alcalin des larves (Manceva et al. 2004). Les protoxines libérées sont ensuite **activées par des protéases du tube digestif** par clivage d'un fragment peptidique en C-terminal ainsi que d'un fragment plus petit en N-terminal (Rukmini et al. 2000, Bravo et al. 2007). La nature du tube digestif et des protéases impliquées dans l'activation jouent un rôle important dans la spécificité des toxines activées. Par exemple, une toxine Cry peut, d'une part montrer une toxicité à la fois pour le Lépidoptère *Pieris brassica* et pour le moustique *Aedes aegypti* lorsqu'elle est activée avec un extrait de tube digestif de *P. brassica* ; et d'autre part, n'être toxique que pour *Ae. aegypti* lorsqu'elle est activée par le tube digestif de ces larves de moustiques (Haider & Ellar 1989).

Une fois activées, les toxines vont **interagir avec un ou plusieurs récepteurs membranaires** des cellules épithéliales (Griffitts & Aorian 2005, Jurat-Fuentes & Adang 2006, Bravo et al. 2007). Quatre principales familles de récepteurs sont décrites pour les toxines Cry (figure 7, Bravo et al. 2007). Deux représentent des récepteurs transmembranaires : les cadhérines (CADR), et les récepteurs glyco-conjugés (GCR). Les deux autres familles représentent des récepteurs ancrés dans les membranes par des glycosylphosphatidyl-inositol (GPI) : les aminopeptidasesN (APN) et les alcalines phosphatases (ALP). D'autres récepteurs peu étudiés, comme les ATPase synthases ou les actines, peuvent également être impliqués dans la fixation des toxines Cry1 ou Cry4 (McNall & Adang 2003, Jurat-Fuentes & Adang 2006, Krishnamoorthy et al. 2007, Bayyareddy et al. 2009).

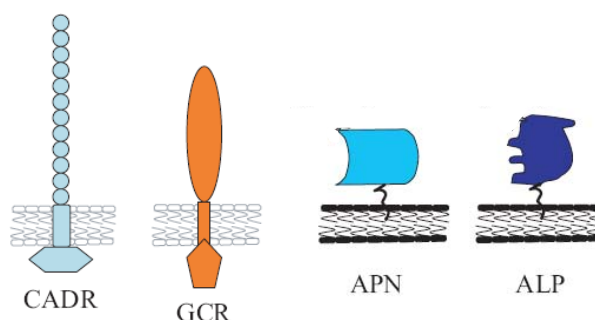


Figure 7 : Représentation des principaux récepteurs membranaires des toxines Cry. Cadherine CADR, récepteur Glyco-conjugé (GCR), AnimopeptidaseN (APN) et Alcaline phosphatase (ALP). Figure adaptée de Bravo et al. 2007.

Le mode d'action de la toxine **Cry1A** produite dans les cultures transgéniques **pour lutter contre les Lépidoptères** est particulièrement bien étudié (figure 8). Une première fixation du monomère avec une cadhérine transmembranaire induit un clivage de l'hélice α -1 du domaine I de la toxine et la formation d'un oligomère de 4 toxines (Gomez et al. 2002). La structure oligomérique permet d'augmenter l'affinité pour le récepteur secondaire auquel elle se fixe ensuite. Ce récepteur secondaire est ancré dans la membrane par un GPI : il peut être une APN chez le Lépidoptère *Manduca sexta* (Bravo et al. 2004) ou une ALP chez *Heliothis virescens* (Jurat-Fuentes 2004). L'insertion de la structure oligomérique dans la membrane et la formation du pore qui s'en suit induit un choc osmotique, la destruction des cellules épithéliales et enfin, la mort de la larve (Shnepf et al. 1998, Bravo et al. 2007). Plus récemment, il a été démontré qu'en plus de provoquer la mort des cellules par lyse osmotique, la toxine Cry1A semble également activer une voie de mort cellulaire lors de sa fixation sur la

cadhérine (Zhang et al. 2005). Cette voie aboutit à l'activation de protéines kinases A qui initient la destruction des parois cellulaires et l'apoptose des cellules (Zhang et al. 2006, Soberon et al. 2009).

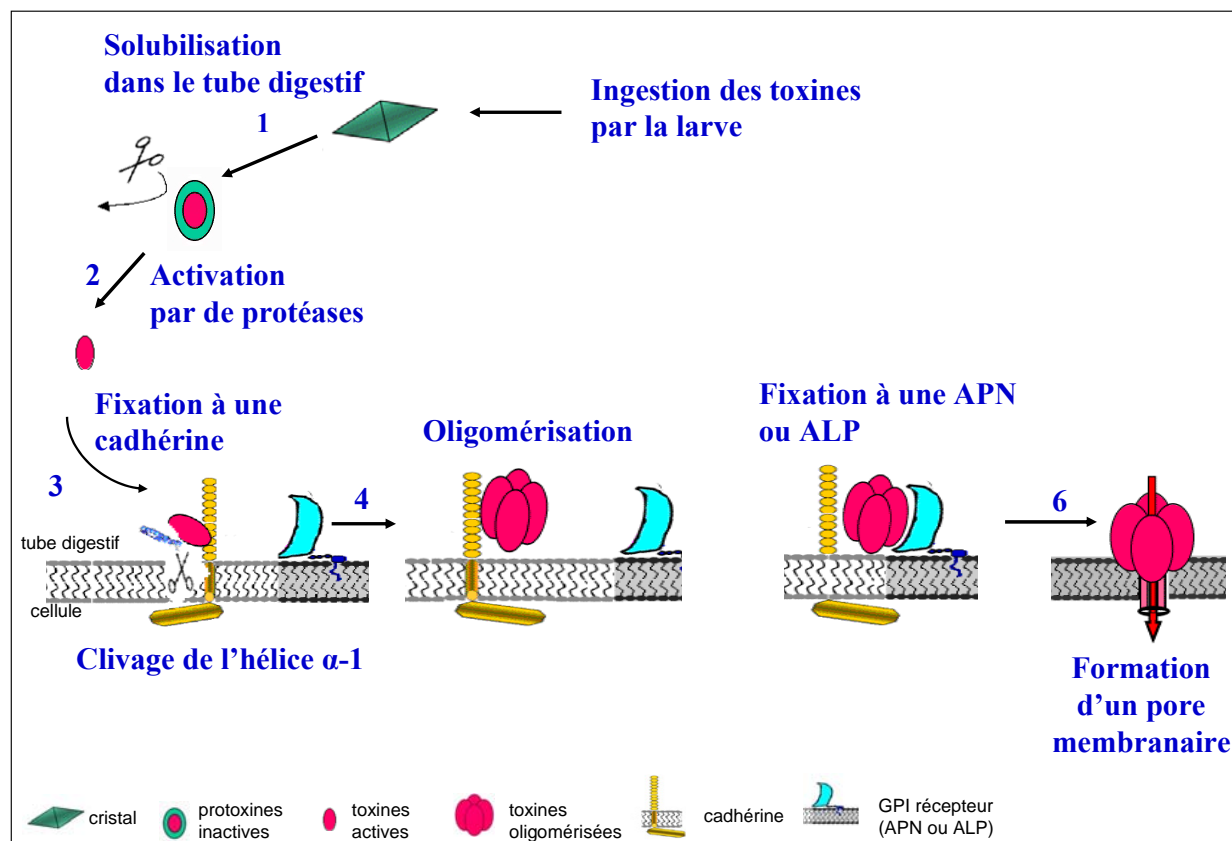


Figure 8 : Mode d'action de la toxine Cry1A chez les lépidoptères (adapté de Pardo-Lopez et al. 2009).

Chez les moustiques, seulement quelques récepteurs membranaires aux toxines Cry ont été identifiés. Plusieurs récepteurs membranaires pour les toxines Cry11A et Cry4B ont été détectés par fixations spécifiques *in vitro* chez *Aedes aegypti* ou *Anopheles gambiae* (Buzdin et al. 2002, Fernandez et al. 2006, Hua et al. 2008, Chen et al. 2009). Parmi eux, Fernandez et al. (2006) ont identifié une **alkaline phosphatase** comme un récepteur de la toxine Cry11A. Si les récepteurs membranaires sont souvent décrits comme très spécifiques et limités à des toxines très proches (Griffitts & Aorian 2005, Pigott *et al.* 2007), l'alkaline phosphatase identifiée permet la fixation de deux toxines assez éloignées : Cry11A et Cry4B (moins de 45% de similarité de séquences protéiques). Chez le moustique *Anopheles quadrimaculatus* une **aminopeptidase N** a été identifiée comme récepteur de la toxine Cry11B (Abdullah *et al.* 2006, Zhang et al. 2008). La fixation à ce récepteur est spécifique de la toxine Cry11B et celui-ci n'interagit ni avec la protéine proche Cry11A ni avec la protéine

Cry4B. Enfin, plus récemment, une **cadhérine** a été identifiée comme récepteur à la toxine Cry4B chez *Anopheles gambiae* (Hua et al. 2008).

II.3.3- Les toxines cytolytiques Cyt

Les protéines de la famille Cyt ne partagent pas de séquences homologues avec celles de la famille Cry et possèdent un mode d'action très différent : à l'instar des toxines Cry, elles **ne nécessitent pas de récepteurs** membranaires spécifiques. Les protéines Cyt (figure 9) possèdent un seul sous-domaine composé de deux hélices α enveloppant un feuillet β (Perez et al. 2005). Deux grands mécanismes d'action sont décrits et discutés pour cette famille de toxines (Promdonkoy & Ellar 2003, Butko 2003, Manceva et al. 2005). Premièrement, ces toxines hautement hydrophobes présentent une affinité particulière avec la partie lipidique des membranes, notamment avec les acides gras insaturés (Sayeed et al. 2001). Les toxines Cyt pourraient donc interagir directement avec les phospholipides afin de s'insérer dans les membranes en formant un pore (c'est la théorie « pore forming »). La deuxième hypothèse est que ces toxines aient la capacité de détruire les liaisons lipidiques des membranes et de les déstructurer sans former de pore (c'est la théorie du « détergent »).

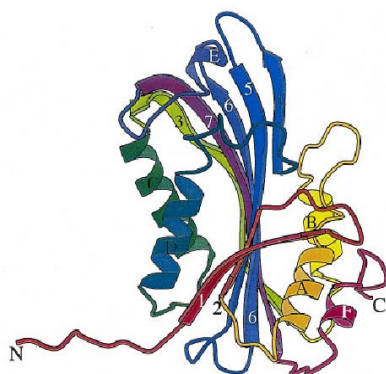


Figure 9 : Structure tridimensionnelle de la toxine Cyt1A

II.4- Complexité des mélanges et interactions de synergisme entre les toxines

La particularité de ces protéines est qu'elles interagissent de façon synergique (Wu et al. 1994, Poncet et al. 1995, Perez et al. 2005). On parle de synergisme lorsque le mélange de deux produits induit une mortalité plus importante que leur simple effet additif. A l'inverse, on parle d'antagonisme lorsque le mélange de deux produits induit une baisse de leur efficacité. Aucune interaction antagoniste n'a été décrite pour les toxines du *Bti*. Les interactions de synergisme les plus importantes impliquent la toxine Cyt1A qui permet

d'augmenter plus de 20 fois la toxicité des mélanges de toxines Cry (Wu et al. 1994, Wirth et al. 1997). Il a été démontré récemment qu'un domaine de la toxine Cyt1A situé au niveau de la boucle $\beta 6$ - αE peut fixer trois boucles du domaine II des toxines Cry (boucles 2, $\alpha 8$ et $\beta 4$, Perez et al. 2005). De plus la toxine Cyt1A semble avoir la même action que les récepteurs membranaires cadhérines qui, grâce au clivage de l'hélice α -1 du domaine I des toxines Cry, permettent la formation d'une structure oligomérique qui pourra ensuite s'insérer dans les membranes des cellules épithéliales et former un pore (Perez et al. 2007). La présence de la toxine Cyt1A permet donc d'augmenter largement le nombre de récepteurs membranaires et ainsi l'activité et la toxicité des toxines Cry. Ces interactions ont été décrites entre les toxines Cyt1A et Cry11A (Perez et al. 2007) et sont attendues pour les toxines Cry4B dont la toxicité est également augmentée en présence de Cyt1A (Perez et al. 2005).

II.5- La résistance aux toxines de *Bacillus thuringiensis*

II.5.1- Mécanismes de résistance

Aucun mécanisme de résistance aux toxines du *Bti* n'a encore été décrit chez les diptères. Cependant de nombreux mécanismes de résistance aux toxines Cry ont été décrits chez les Lépidoptères (Morin et al. 2003), les Coléoptères (Fabrick et al. 2009) ou les Nématodes (Griffitts et al. 2001). La **modification métabolique de l'activation des protoxines** (Keller et al. 1996, Oppert 1997, Rukmini et al. 2000, Rajagopal 2009) et la **modification des récepteurs cibles** au niveau des membranes des cellules épithéliales (Gahan et al. 2001, Morin et al. 2003, Jurat-Fuentes et al. 2004, Herrero et al. 2005) sont à ce jour les principaux mécanismes impliqués dans la résistance aux toxines Cry. L'implication directe de mécanismes de détoxification dans la résistance aux toxines du *Bt* n'a encore pas été mise en évidence de façon formelle. Cependant certaines enzymes de détoxification peuvent être surexprimées en présence de toxines Cry (van Munster et al. 2007), et certaines estérases semblent pouvoir séquestrer les toxines Cry (Gunning et al. 2005). Enfin, d'autres mécanismes potentiels de résistance peuvent intervenir à toutes les étapes du mode d'action des toxines (figure 10) : modification du comportement alimentaire, mécanismes de réparation cellulaires pouvant notamment impliquer des estérases (Gunning et al. 2005, Meunier et al. 2006), ou modification du système immunitaire (Huffman et al. 2004, Rahman et al. 2004).

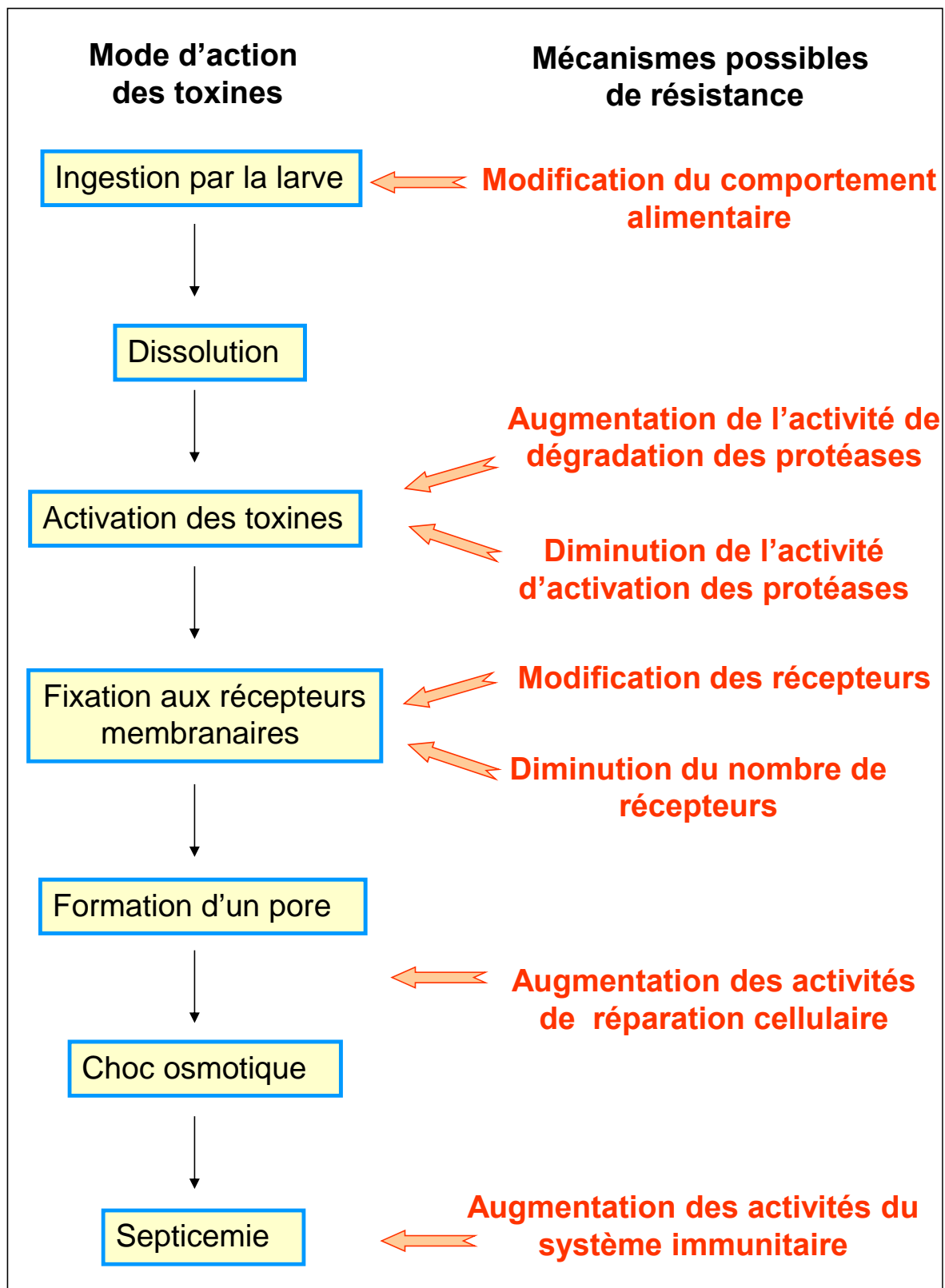


Figure 10 : Mécanismes possibles de la résistance aux toxines Cry à chaque étape de leur mode d'action.

II.5.2- Résistances croisées entre toxines

Les mécanismes de résistance croisée entre les toxines Cry sont complexes et semblent principalement liés aux mécanismes de résistance impliqués. Tout d'abord, lorsque la résistance implique une modification de l'activité des protéases, des résistances croisées peuvent être observées pour de nombreuses toxines car les protéases sont impliquées dans le clivage non spécifique et l'activation de plusieurs d'entre elles (Gould *et al.* 1992, Rukmini *et al.* 2000). Cependant, lorsque la résistance implique une modification du récepteur membranaire de la toxine, les résistances croisées se cantonnent généralement aux toxines très proches. La forte spécificité entre des toxines et leurs récepteurs est la raison principale du faible nombre observé de résistances croisées liés aux mécanismes de mutation des récepteurs (Tabashnik *et al.* 1997, Jurat-Fuentes *et al.* 2003, Griffiths & Aorian 2005, Pigott *et al.* 2007). Par exemple, la toxine Cry11B se fixe sur une aminopeptidase N chez le moustique *Anopheles quadrimaculatus*, alors que ce récepteur ne permet pas la fixation de la toxine très proche Cry11A (Abdullah *et al.* 2006).

II.6- Rémanence du Bti dans l'environnement et toxicité des litières végétales dans la région Rhône-Alpes.

Bien qu'on le retrouve dans de nombreux habitats, *Bacillus thuringiensis* est considéré comme très peu compétitif dans les milieux naturels (Schnepf *et al.* 1998, Maduell *et al.* 2008). Plusieurs méthodes ont été mises au point pour évaluer la persistance des spores et des toxines de *Bt* dans l'environnement après les traitements par évaluation de la toxicité des sols (Vettori *et al.* 2003, Muchaonyerwa *et al.* 2004), recherche des bactéries par PCR (Hansen & Hendriksen 2001, De Respinis *et al.* 2006) ou des toxines par ELISA (Stotzky 2004). Globalement, la quantité de spores et de toxines de *Bt* chute rapidement dans les semaines ou les mois suivant les traitements (Vettori *et al.* 2003, Muchaonyerwa *et al.* 2004, Hajaij *et al.* 2005, De Respinis *et al.* 2006).

Le Laboratoire d'Ecologie Alpine de Grenoble travaille depuis plusieurs années à caractériser la **forte toxicité de litières végétales** collectées dans certains gîtes à moustiques de la région Rhône-Alpes (David *et al.* 2000). La toxicité des prélèvements a été mesurée au laboratoire par bioessais sur des larves d'une souche standard du moustique *Aedes aegypti* (figure 11). Plusieurs mois après les traitements (avril-mai), l'augmentation de la toxicité

observée suggère que contrairement à ce qui est couramment admis, la bactérie peut proliférer dans les habitats naturels de moustiques après épandage.

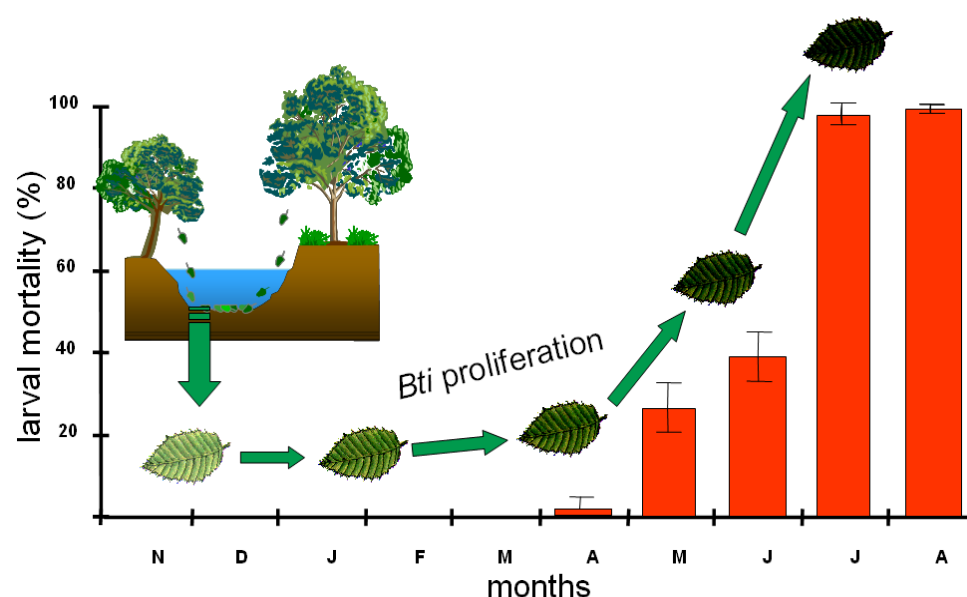


Figure 11 : Toxicité larvaire de prélèvements de litières végétales collectés dans un gîte à moustique de l'Ain (adapté de David et al. 2000). Le pourcentage de mortalité observé lors des bioessais traduit la toxicité des échantillons.

La **prolifération et l'accumulation des bactéries *Bacillus thuringiensis israelensis*** dans les gîtes à moustiques peuvent conduire à une exposition des larves à de faibles doses de toxines du *Bti* tout au long de leur développement, favorisant potentiellement l'apparition de la résistance.

En résumé : Le bactério-insecticide *Bti* est devenu la seule alternative aux insecticides chimiques pour les traitements larvaires depuis 2006 en France métropolitaine. Il est composé de 6 toxines perforant le tube digestif et entraînant la mort des larves traitées. Le mode d'action de ces toxines est complexe et de nombreux mécanismes peuvent être impliqués dans la résistance. En Rhône-Alpes, la rémanence du *Bti* dans l'environnement est susceptible de favoriser l'apparition de résistances.

III- Facteurs influençant l'apparition et l'évolution de la résistance aux pesticides

De nombreux facteurs peuvent influencer l'apparition et l'évolution de la résistance (Georghiou et Taylor 1986, May et Dobson 1986, Gould 1995, Ffrench-Constant 2004, Roux et al. 2008). Ces facteurs sont généralement regroupés en trois catégories:

- les facteurs **biologiques** ou traits d'histoire de vie sont propres à la biologie des espèces,
- les facteurs **génétiques** sont liés au mécanisme de résistance lui-même et à son effet associé sur le phénotype des individus qui les possèdent,
- les facteurs **opérationnels** font référence aux pratiques d'application des pesticides.

III.1- Les facteurs biologiques

D'un point de vue statistique, l'apparition d'une mutation rare dans une population est directement corrélée **au nombre d'individus** présents dans la population ainsi qu'**au nombre de générations** par unité de temps (nombre d'individus soumis à la sélection dans un temps donné). Par exemple, chez les bactéries, le nombre élevé de générations est souvent décrit comme étant la cause de l'apparition et de l'évolution plus rapide des résistances aux antibiotiques. Chez les insectes, Georghiou et Taylor en 1986 ont décrit une corrélation négative entre le nombre de générations par an chez 6 espèces et le temps d'apparition d'une résistance à l'aldrin, un insecticide organochloré utilisé dans les années 60. Le temps d'apparition de la résistance aux pesticides peut néanmoins rester variable entre espèces ayant le même temps de génération, en fonction d'autres facteurs biologiques propres à l'espèce considérée.

La migration est un des facteurs susceptible d'avoir le plus d'impact dans le maintien et l'évolution de la résistance dans les populations. Elle favorise d'une part la dispersion de la résistance à grande échelle, cependant, sur une échelle locale, elle peut aussi avoir l'effet inverse. En effet, elle peut contrecarrer les changements de fréquence allélique causés par la sélection en réintroduisant des allèles sensibles, limitant ainsi les possibilités d'adaptation locale (Lenormand 2002), s'il existe des populations 'source' d'insectes sensibles qui se maintiennent dans des zones non traitées (refuges). Plusieurs stratégies de gestion étudiées

pour les insectes ont pour principe de maximiser cette migration des refuges vers les zones traitées, qui va agir à l'encontre de la sélection des gènes de résistance (Lenormand et Raymond 1998, Vacher et al. 2003, Glaser et Matten 2003). La migration dépend de la capacité de dispersion ainsi que des préférences écologiques des espèces.

Le **mode de reproduction** est également un facteur important influant dans l'évolution de la résistance, car il est à la base de la structure génétique des populations et affecte leur dispersion (surtout chez les plantes pouvant être strictement allogame ou autogames). Les reproductions allogames chez les plantes ou polygames chez les insectes favorisent le développement de la résistance, sa dispersion dans l'espace et permettent à l'allèle de résistance de rencontrer des fonds génétiques diversifiés (Georghiou et Taylor 1986).

III.2- Les facteurs génétiques

L'apparition de résistances aux pesticides peut impliquer deux phénomènes distincts au niveau moléculaire (Ffrench-Constant 2007). Tout d'abord, de **nouvelles mutations** apparues après l'introduction du pesticide peuvent être sélectionnées. Leur vitesse d'apparition dans les populations est alors liée au **taux de mutation**, un taux de mutation élevé favorisant l'évolution rapide des résistances. Le taux de mutation peut varier beaucoup entre les différentes espèces, mais aussi entre les familles de gènes au sein d'une même espèce (Preston & Powles 2002). Ces familles de gènes peuvent différer par le nombre de gènes impliqués, leur position le long des chromosomes, le nombre de copies ou encore leur taux de recombinaison (de Meaux & Mitchell-Olds 2003). Certains éléments du génome présentant un fort taux de mutation, comme les éléments transposables par exemple, sont fréquemment impliqués dans l'adaptation rapide et l'évolution des génomes (Bennetzen 2000, Kazazian 2004, Oliver & Greene 2009). Par exemple, l'un des mécanismes de résistance rapide aux insecticides implique l'insertion de rétrotransposons soit directement dans le gène codant pour leur cible (Aminetzach et al. 2005, Yang et al 2007), soit dans les éléments de régulation des gènes (Schlenke & Begun 2004, Chen & Li 2007).

Ensuite, un polymorphisme déjà présent dans les populations avant l'introduction des pesticides peut être sélectionné (Hartley et al. 2006, Ffrench-constant 2007). **La fréquence initiale de l'allèle de résistance** dans la population est alors déterminante dans l'évolution de

cette résistance. Une forte fréquence initiale est en effet généralement favorable à un développement rapide de la résistance lorsque le pesticide est utilisé. Par exemple, la présence d'un allèle de résistance en forte fréquence (19%) dans les populations australiennes de la mouche *Lucilia cuprina* avant l'utilisation du malathion est probablement la cause de l'évolution très rapide de la résistance à cet insecticide (Hartley et al. 2006). D'autres études ont estimé la présence d'allèles de résistance aux toxines du *Bt* à des fréquences faible (de 1.10^{-3} à 5.10^{-3}) dans des populations de Lépidoptères et de Coléoptères jamais exposées à cet insecticide (Gould et al. 1997, Wenes et al. 2006). Cependant, lorsqu'elle est faible, la fréquence initiale est difficilement mesurable au sein des populations naturelles (Gould et al. 1997, Wenes et al. 2006). Dépendant d'un équilibre mutation/sélection (Georghiou & Taylor 1986, Zhang 2004), la fréquence initiale peut alors être estimée en étudiant, d'une part, le taux de mutation permettant l'apparition de l'allèle de résistance et son degré de dominance et, d'autre part, le coût sur la fitness qui lui est associé.

Lorsqu'une résistance est apparue dans une population, de nombreux facteurs génétiques vont influencer son évolution. **Les gènes conférant une résistance** ont été très étudiés et sont actuellement connus pour une majorité de type de résistances observées (Tranel & Wright 2002, Ffrench-Constant et al. 1998, 2004, Hemingway et al. 2004). De manière générale, l'évolution de caractères adaptatifs est le résultat de mutations sur plusieurs gènes ayant de petits effets additifs. Dans le cas des pesticides entraînant une forte pression de sélection, il a été observé que l'apparition de résistances impliquait **un nombre plutôt restreint de gènes à effet majeur**. Dans la plupart des cas, un seul gène est impliqué dans la résistance (Jasieniuk et al. 1996, Hemingway et al. 2004). **L'hérédité de la résistance** est également un facteur important dans l'évolution de celle-ci au sein des populations, une hérédité monogénique favorisant la transmission de la résistance et sa propagation dans la population sur plusieurs générations.

Lorsqu'un allèle conférant une résistance apparaît dans une population, il est initialement au stade hétérozygote. Sa probabilité de se fixer dans la population va donc être très sensible à **son degré de dominance** : un seul allèle dominant conférant la résistance permet aux individus hétérozygotes d'une espèce diploïde de survivre au traitement. A l'inverse, si la résistance est récessive, le mutant hétérozygote sera alors sensible aux pesticides et aura une forte probabilité de disparaître dès le premier traitement. La dominance

ou la récessivité d'un allèle de résistance est facilement mesurable et est connue pour de nombreuses mutations (Bourguet et al. 1997, Roux et al. 2005). Dans la plupart des cas, le caractère de résistance est globalement dominant (Charlesworth 1998, Jasienicuk et al. 1996), cependant le degré de dominance d'un allèle peut varier suivant l'environnement, le pesticide ou l'espèce concernée (Bourguet et al. 1996, Bourguet et al. 1997, Roux et al. 2005).

Les mécanismes de résistance affectant des gènes majeurs peuvent avoir **des effets** pléiotropes, c'est-à-dire qu'ils peuvent affecter l'expression de plusieurs caractères phénotypiques simultanément, entraînant une réduction de la fitness des individus résistants (Uyenoyama 1986). Le succès évolutif d'une résistance à un stress biotique (résistance aux pathogènes), ou abiotique (résistance aux pesticides), dépend particulièrement du bénéfice lié à la résistance et de l'effet pléiotrope négatif du gène de résistance sur la fitness. Si le **coût de la résistance** sur la fitness est élevé, l'allèle de résistance va induire un désavantage sélectif en absence de pesticides, entraînant son élimination des populations polymorphes (Fisher 1928). Ceci est important pour prédire la trajectoire évolutive des allèles de résistance aux pesticides parce que le coût de la résistance peut parfois être assez élevé et contrebalancer l'avantage sur la fitness en présence de l'agent sélectif, empêchant ainsi sa fixation dans la population. De plus, le coût de la résistance est l'un des facteurs déterminant dans le choix des stratégies de management de la résistance car le succès de certaines d'entre elles (la rotation ou la stratégie « haute-dose-refuge » par exemple) dépend de la diminution de la fréquence de l'allèle de résistance en absence du pesticide sélectif (Lenormand & Raymond 1998, Hall et al. 2004).

III.3- Les facteurs opérationnels

III.3.1- Autres pressions de sélection : historique et écologie des gîtes larvaires

L'historique des traitements dans les populations est un élément très important qui peut déterminer l'émergence rapide de résistance à un nouvel insecticide. En effet, de nombreuses résistances croisées ont été observées dans les populations de moustiques, et la sélection passée avec un insecticide peut permettre des résistances à d'autres insecticides jamais utilisés dans les populations. Tout d'abord le même allèle peut permettre une résistance à différents insecticides ayant le même **mode d'action** (Brogdon & McAllister 1998). C'est le cas par exemple de la mutation Ache dans l'acétylcholinestérase qui permet

une résistance croisée à deux familles d'insecticides ciblant spécifiquement ce récepteur : les carbamates et les organophosphorés. De plus, les mécanismes de détoxications, non spécifiques du mode d'action des molécules insecticides, peuvent permettre des résistances croisées entre de nombreuses familles d'insecticides (figure 12).

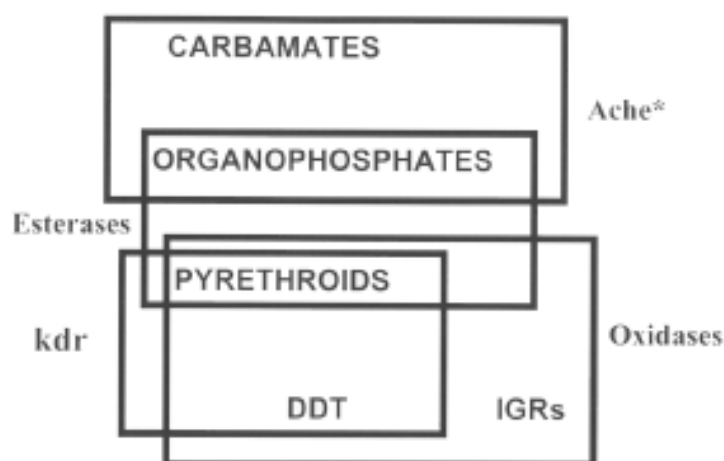


Figure 12 : Résistances croisées connues pour quatre des principales classes d'insecticides chimiques (Brogdon & McAllister 1998). Les mécanismes de résistance impliqués sont soit des mutations de cible (Ache, Kdr ou IGRs), soit l'amplification d'enzymes de détoxications (estérases,...).

D'autres pressions de sélection comme **les pollutions** présentes dans les gîtes à moustiques (autres pesticides, métaux lourds,...) peuvent également favoriser l'augmentation des activités enzymatiques de détoxication et les résistances croisées entre polluants et insecticides. Par exemple, des herbicides ou des métaux lourds peuvent induire des changements d'expressions de certaines enzymes de détoxications et des résistances croisées chez le moustique *Aedes aegypti* avec certains organophosphorés ou pyréthrinoïdes (Boyer et al. 2006, Poupardin et al. 2008, Riaz et al. 2009).

III.3.2- Stratégies de gestion de la résistance

De façon évidente, la solution la plus simple pour éviter la résistance est de se passer de pesticide ou de changer de pesticide dès lors que la résistance est décelée. Cependant, cette solution n'est pas toujours envisageable car le nombre de nouvelles molécules sur le marché est très limité et la découverte de nouveaux modes d'action est devenue assez rare (Powles et al. 1997, Broadhurst 1998). **Des stratégies de gestion** utilisant un nombre restreint de molécules doivent donc être mises en place pour retarder l'évolution de la résistance et ainsi

prolonger la durée de vie des pesticides. Plusieurs stratégies ont été proposées dans la lutte contre les pesticides (LeBaron 1986, Denholm & Rowland 1992). Parmi elles, la **rotation** de molécules a pour but de réduire l'évolution de la résistance en limitant la période d'exposition à chacun des pesticides utilisés. L'hypothèse est que la fréquence en individus résistants diminue en absence du pesticide grâce à la migration d'individus sensibles et/ou à un coût sur la fitness des individus résistants. Le **mélange** de plusieurs pesticides a lui pour principe de tuer les individus résistants à l'un des pesticides par adjonction d'autres pesticides à mode d'action différent. Lorsque les produits n'impliquent pas de résistances croisées, les individus doivent développer des résistances à chacun des produits du mélange pour survivre, ce qui retarde l'apparition de la résistance.

D'autres stratégies de gestion utilisées principalement chez les insectes ont pour principe d'utiliser la migration qui va agir à l'encontre de la sélection des gènes de résistance (Vacher et al. 2003, Glaser et Matten 2003, Liu & Tanbashnik 1997, Lenormand & Raymond 1998). Parmi elles, la **stratégie « haute-dose-refuge »** préconise une application localisée du pesticide en laissant une parcelle (dite refuge) non traitée à proximité. Les individus présents dans la zone de refuge ne sont pas soumis à la sélection et ne développent donc pas de résistance. Ils vont ensuite migrer et se reproduire avec les individus résistants de la population traitée. Dans le cas d'une résistance récessive, sa « dilution » par migration d'une population sensible proche va induire l'apparition quasi exclusive d'individus hétérozygotes aisément contrôlables. Les possibilités de contrôler la résistance dans la parcelle traitée vont donc dépendre de la fréquence du gène de résistance dans la population, du degré de dominance de la résistance, du coût de la résistance dans la zone non-traitée, des flux de gènes entre zones traitées et non-traitées, qui dépendent de la connectivité et des proportions respectives de zones traitées et non traitées, et de l'intensité de la pression de sélection (May 1986, Carrière & Tabashnik 2001).

En résumé : Lorsqu'une résistance apparaît dans une population, son évolution est déterminée par de nombreux facteurs : les traits d'histoire de vie de l'espèce, les facteurs génétiques et écologiques liés à la résistance ainsi que les facteurs opérationnels liés à la nature et à l'application de la pression de sélection. Connaître ces facteurs peut permettre de prévoir l'évolution de la résistance dans les populations naturelles et d'adopter des stratégies de traitement limitant son évolution.

IV- Obtenir et mesurer la résistance des moustiques au *Bti*

IV.1- Mesurer les taux de résistance

Des bioessais standardisés permettent de comparer la sensibilité de populations de moustiques à un insecticide (WHO 2005). Pour mesurer la résistance au *Bti*, ils consistent à exposer des lots de 20 larves de moustiques dans 50 ml de solutions insecticides. Plusieurs concentrations recouvrant une large gamme de mortalité sont nécessaires afin de déterminer la **Concentration Létale pour 50% des individus** ou LC_{50} . Le taux de résistance (ou rapport de résistance RR) est calculé comme le ratio de la LC_{50} de la population testée sur celui d'une population sensible :

$$\text{Taux de résistance} = LC_{50} \text{ testé} / LC_{50} \text{ sensible}$$

Par exemple, lorsqu'il faut une dose 10 fois plus élevée pour tuer 50% des individus d'une population testée par rapport à une population sensible, la population testée considérée comme 10 fois plus résistante à cet insecticide.

Ces bioessais standardisés permettent de mesurer la sensibilité de groupes de larves, mais ne permet pas d'obtenir de données individuelles. Il n'est donc pas possible de connaître le niveau de résistance d'un individu donné. D'autres types de bioessais comme ceux basés sur une dose diagnostique peuvent permettre de mieux phénotyper la résistance au niveau individuel.

IV.2- Des souches de *Bti* recombinantes pour l'étude de la résistance aux toxines individuelles

Les toxines du *Bti* agissant en synergie, une résistance à l'une d'entre elles ne sera peut être pas détectable en testant le *Bti* comprenant les 6 toxines en mélange. Afin de produire les toxines de façon individuelle, **des souches de *Bti* recombinantes** ne contenant qu'un seul gène codant pour une toxine ont été fabriquées et nous ont été fournies. Tout d'abord, la souche de *Bti* 4Q2-81 a été débarrassée de ses plasmides afin qu'elle ne produise plus de cristal protéique. Ensuite, des plasmides recombinants ne contenant qu'un seul gène codant pour une toxine ont été produits à partir d'*Escherichia Coli*. C'est l'insertion de ces plasmides dans la souche de *Bti* 4Q2-81 qui a permis l'obtention des souches de *Bti* produisant les toxines de façons individuelles. Quatre souches permettent la production des 4

principales toxines du *Bti* : Cry4A, Cry4B, Cry11 et Cyt1A (Delécluse et al. 1993, Poncet et al. 1993, Wu & Federici 1993, Wu et al. 1994 respectivement).

Les toxines individuelles de *Bti* sont obtenues à partir de mises en culture de ces bactéries (Lecadet *et al.* 1980). Lorsque la sporulation des bactéries est atteinte, les toxines sont extraites, purifiées et conservées à -20°C jusqu'à utilisation (Delécluse et al. 1993, Wu et al. 1994).

IV.3- Espèces modèles et sélection au laboratoire

La sélection d'**une espèce modèle de laboratoire** à un insecticide, permet de pouvoir évaluer assez rapidement l'évolution potentielle de la résistance à cet insecticide avant son apparition sur le terrain. Pouvoir connaître à l'avance les mécanismes de résistance ou les degrés de dominance de la résistance à un insecticide peut permettre de détecter la résistance sur le terrain et de mettre en place rapidement des stratégies limitant leur évolution.

Travailler sur des espèces de moustiques de laboratoire offre de nombreux avantages. Tout d'abord, sélectionner en laboratoire permet de **contrôler de nombreux facteurs** pouvant influencer sur l'évolution de la résistance, comme l'intensité de la pression de sélection, les flux de gènes ou encore l'histoire de la population sélectionnée. Ensuite, le **nombre de générations** de sélection par an peut être relativement élevé en laboratoire. Par exemple, jusqu'à 7 générations de sélection par an sont possibles chez l'espèce de moustique *Aedes aegypti*. Enfin de nombreuses **ressources génétiques** sont généralement disponibles pour ces espèces modèles. Les espèces *Anopheles gambiae* et *Aedes aegypti* sont par exemple entièrement séquencées (Holt et al. 2002, Nene et al. 2007) et la séquence consensus de leur génome est disponible pour l'ensemble de la communauté scientifique sur les bases de données génétiques accessibles par internet (vectorbase, NCBI, Ensembl).

Plusieurs études ont sélectionné en laboratoire des populations de moustiques avec du *Bti*, sans autant obtenir des niveaux de résistance élevés. Après 20 générations de sélection sur *Aedes aegypti* (Goldman et al. 1986), *Culex pipiens* (Saleh et al. 2003) ou *Culex quinquefasciatus* (Mittal et al. 2005) des taux de résistance de seulement 2 fois, 3 fois et 2 fois respectivement ont été mesurés.

Georgiou & Wirth (1997) ont utilisé des souches recombinantes de *Bti* afin de sélectionner le moustique *Culex pipiens* avec des combinaisons différentes de 1 à 4 toxines de *Bti* pendant une trentaine de générations. Une résistance de 50 fois a été sélectionnée avec la toxine Cry4D seule, alors qu'une résistance plus faible (13 fois) a été sélectionnée en combinant les 3 toxines Cry4A, B et D. Enfin, si la toxine Cyt1A est ajoutée aux toxines Cry, le taux de résistance reste très faible et comparable à ceux obtenus avec le *Bti* total (résistance de 3 fois seulement).

IV.4- Résistance au Bti chez les espèces de terrain

Une mesure précise de la résistance aux insecticides des **larves de moustique directement collectées sur le terrain** est parfois difficile car de nombreux facteurs peuvent influencer la sensibilité des larves. Tout d'abord, lorsque l'on compare de nombreuses populations, il est assez difficile d'échantillonner des larves exactement au même stade physiologique et ayant une taille similaire. Or ces différences peuvent influencer la tolérance des larves au *Bti* (Nayar et al. 1999, Stevens et al. 2004). De plus, des facteurs environnementaux comme la composition chimique de l'eau, sa température, ou la qualité de la nourriture accessible dans les gîtes à moustiques peuvent également influencer la tolérance des larves au *Bti* (Katbeh-Bader et al. 1999, Lee & Zairi 2005, Lacey 2007).

Plusieurs études ont cherché à évaluer l'évolution de la résistance au *Bti* dans les **populations naturelles de moustiques traitées** depuis plusieurs années (Goldman et al. 1986, Wirth et al. 2001, Paul et al. 2005). En 1993, Becker et Ludwig n'ont pas mis en évidence de diminution significative de la sensibilité de populations naturelles allemandes d'*Aedes vexans* traitées depuis 10 ans au *Bti* en comparaison avec des populations non-traitées. Le même résultat a été obtenu par Goldman et al. (1986) qui ont sélectionné au laboratoire avec du *Bti* des populations de terrain d'*Aedes aegypti* pendant 14 générations : une seule souche sur trois a montré une augmentation de la résistance de seulement 2 fois au *Bti*. D'autres études plus récentes ont trouvé des taux de résistance faibles mais significatifs en comparant des populations sensibles et des populations de terrain traitées de *Culex pipiens* (jusqu'à 10 fois plus résistant, Wirth et al. 2001), *Anopheles sinensis* (jusqu'à 6 fois plus résistant, Zhang et al. 2004) ou *Ochlerotatus cataphylla* (Boyer et al. 2007). Dans la plupart de ces études, une grande variabilité a été observée dans la réponse des larves aux bioessais et la majorité des populations testées ne montraient que **des taux de résistance de l'ordre de 2**

à 3 fois. Une seule étude a pu mettre en évidence une résistance élevée (plus de 30 fois) au *Bti* chez une population de *Culex pipiens* New-Yorkaise (Paul *et al.* 2005). Cependant, depuis 2005, aucune étude supplémentaire n'a été publiée sur cette population.

Enfin, aucune étude n'a encore évalué l'évolution des résistances aux toxines individuelles du *Bti* dans les populations naturelles.

<p>En résumé : Peu de cas de résistance au <i>Bti</i> ont été observés en populations naturelles. Cependant, la résistance aux toxines individuelles du <i>Bti</i> peut être sélectionnée rapidement en laboratoire. Des souches de <i>Bti</i> recombinantes sont disponibles afin de produire les toxines du <i>Bti</i> individuellement et d'étudier l'évolution de la résistance à chacune de ces toxines.</p>

V- Rechercher les bases génétiques de la résistance au *Bti*

V.1- Les quatre forces évolutives impliquées dans l'adaptation

Quatre forces évolutives agissent sur la structure génétique des populations au fil des générations : la mutation, la sélection naturelle, la dérive génétique et la migration.

Tout d'abord, **la mutation** a un rôle primordial car elle permet des modifications aléatoires dans les génomes par mutations ponctuelles, insertions, délétions, ou duplications. C'est la seule force évolutive qui produit de nouveaux allèles, générant de la variabilité génétique. Les mutations sont des événements généralement rares dans les populations et produisent principalement de la diversité neutre ou des allèles délétères (Charlesworth & Charlesworth 1998).

Lorsqu'une mutation confère un phénotype avantageux à l'individu qui la porte, la **sélection naturelle** est la force qui le favorise dans la population (Darwin 1859) : un avantage sélectif se traduisant par une meilleure survie et reproduction de l'individu par rapport aux autres individus de la population. En modifiant au cours du temps la distribution des caractères phénotypiques et des allèles associés, la sélection naturelle est la force évolutive à l'origine de l'adaptation. La sélection naturelle peut ainsi avantager (sélection positive) ou désavantager (négative) un allèle, modifier la valeur d'un caractère phénotypique (directionnelle), réduire sa variance (stabilisante) ou favoriser la coexistence de plusieurs phénotypes distincts pour un même caractère (disruptive).

Les processus de dispersion des individus permettent des échanges génétiques entre les populations. La **migration** est une force évolutive qui a beaucoup d'impact dans le maintien et l'évolution des allèles et des caractères adaptatifs. A une échelle locale, elle tend à homogénéiser les fréquences alléliques entre les populations et donc à contrebalancer les effets de la sélection naturelle. Cependant, à plus grande échelle, elle permet la dispersion dans l'espace de la variabilité génétique à la base de l'adaptation.

La **dérive génétique** est un élément stochastique qui peut influencer de façon non dirigée et aléatoire les fréquences alléliques d'une génération à une autre. Elle est particulièrement élevée dans les populations à faibles effectifs. Il est important de ne pas négliger les effets aléatoires de la dérive génétique, car ils peuvent dans certain cas porter la même signature génétique que la sélection naturelle.

V.2- Les méthodes utilisées pour détecter la sélection dans les génomes

Comprendre les mécanismes moléculaires impliqués dans l'adaptation et la sélection est un des enjeux majeurs de la biologie évolutive (Orr 2005, Stinchcombe & Hoekstra 2008). Les objectifs sont de rechercher la nature des bases génétiques de l'adaptation ; les chaînes métaboliques, les gènes et les mutations impliqués. Plusieurs méthodes moléculaires peuvent être utilisées. Globalement, elles consistent :

- à comparer l'expression des gènes entre deux populations phénotypiquement différenciées : méthodes transcriptomiques
- à rechercher directement dans les génomes les traces de sélection : méthodes génétiques.

V.2.1- Transcriptomique comparative

La **PCR quantitative** est une méthode qui permet de comparer l'expression de quelques gènes entre deux échantillons en mesurant la quantité de cDNA obtenus après extraction d'ARN et transcription inverse. Son principe est de mesurer en temps réel la quantité d'ADN produite lors de la réaction PCR grâce à des fluorochromes. Cette méthode est très intéressante lorsque les résistances impliquent des modifications d'expression de gènes connus et séquencés. Cette méthode est souvent utilisée pour étudier le niveau de transcription des gènes codant pour des enzymes impliquées dans la détoxification des insecticides chimiques (Poupardin et al. 2008, Riaz et al. 2009).

Lorsque les gènes impliqués dans la résistance ne sont pas identifiés, **les puces à ADN** peuvent permettre d'étudier l'expression de nombreux gènes simultanément. Chez les moustiques, certaines puces d'expression ciblent spécifiquement les gènes codant pour des enzymes de détoxification : les puces 'Detoxication Chip' développées à la Liverpool School of Tropical Medicine pour l'étude des espèces *Anopheles gambiae* et *Aedes aegypti* (David et al. 2005, Strode et al. 2008). Ces puces permettent de mesurer la différence d'expression entre plusieurs populations pour tous les gènes de détoxification connus pour ces espèces, incluant tous gènes codant pour les P450s, les GST et les estérases.

Enfin, l'étude de **l'ensemble des gènes exprimés** chez une population peut être utilisée pour rechercher de nouveaux gènes de résistance chez le moustique. Les nouvelles

technologies de **séquençage à très haut débit** permettent aujourd'hui de séquencer sans a priori la totalité des ARN exprimés chez une population (transcriptome) et de comparer leur niveau d'expression avec d'autres populations distinctes phénotypiquement.

V.2.2- Méthodes génétiques

Lorsque l'on a des hypothèses a priori sur les gènes potentiellement impliqués dans l'adaptation, l'**approche « gènes candidats »** peut être utilisée (Martinez-Torres et al. 1998, Weill et al. 2002, Weill et al. 2003, Fitzpatrick et al. 2005). Un « gène candidat » est un gène précédemment identifié comme étant impliqué dans le phénotype d'un organisme et qui est susceptible d'avoir le même rôle chez l'organisme que l'on étudie. Cette approche implique l'étude soit de leur expression, de leur diversité nucléotidique ou des deux. En ce qui concerne la recherche de gènes de résistance aux insecticides chimiques dont les modes d'action et les cibles sont très bien connus, l'approche gènes candidats est très efficace et est souvent utilisée (Martinez-Torres et al. 1998, Weill et al. 2002, Weill et al. 2003). Aujourd'hui, les avancées spectaculaires dans les techniques de séquençage ont permis le séquençage du génome complet de plusieurs centaines d'espèces, facilitant la recherche de gènes candidats chez les espèces non-modèles. L'annotation partielle des génomes reste cependant une des limites de cette méthode, de nombreux gènes étant de fonction inconnue ou non annotés sur les génomes. Dans le cas de la résistance au *Bti*, le nombre très important de familles de gènes potentiellement impliquées limitent cette approche. Une autre stratégie consiste donc à coupler l'approche « gène candidat » avec des approches plus globales qui permettent de détecter les régions génomiques sous sélection chez les individus résistants.

Lorsque le trait est d'origine multigénique, la recherche des régions du génome sous sélection par l'**approche QTL** (Quantitative Trait Loci) apparaît comme une des plus évidentes. Cette approche a été largement utilisée sur les plantes et les animaux (Kearsey & Farqhar 1998, Mackay T. 2001, Flint & Mott 2001, Saavedra-Rodriguez et al. 2008), et près de 10 000 articles traitant de QTL sont répertoriés dans la base de données ISI Web of Science (www.isiknowledge.com). Cette approche permet d'étudier le degré d'association entre le génotype avec des marqueurs moléculaires et la valeur du trait phénotypique associé. L'hypothèse est qu'un marqueur QTL associé à un trait phénotypique se trouve à proximité du gène recherché. Généralement la détection de QTL est effectuée à partir de croisements entre lignées pures se différenciant phénotypiquement pour les traits d'intérêt. Cette technique

nécessite donc d'avoir 1/ des lignées pures différenciées selon le trait phénotypique à étudier 2/ la possibilité de les croiser et d'obtenir plusieurs générations de descendance et 3/ d'avoir accès aux données phénotypiques au niveau individuel.

Dans le cas de la résistance au *Bti*, de nombreuses générations de sélection sont nécessaires afin d'obtenir une fixation des allèles de résistance des souches sélectionnées, puis de générer des lignées homozygotes par croisements dans la souche sélectionnée et dans la souche sensible, pour finalement effectuer le croisement sensible x résistant, et en analyser la descendance F2. Compte tenue de l'état des connaissances, du matériel biologique disponible et du temps imparti, ce travail n'a pas été envisagé au cours de ma thèse.

Révéler des QTL par des **tests d'association** sans avoir recours à des croisements est également possible (Hirschhorn & Daly 2005). Cependant, ne s'affranchissant pas des biais dus à la structure génétique des populations étudiées, cette technique demeure moins fiable. Une autre limitation des approches de génétique d'association provient de l'obtention des données phénotypiques individuelles, car la résistance au *Bti* se mesure classiquement au niveau populationnel sur des groupes de larves. C'est aussi le cas pour l'étude de la résistance au *Bti* en populations naturelles, où de nombreux facteurs non contrôlables provoquent une grande variabilité de réponse dans les bioessais et biaisent les valeurs de résistance obtenues. Ces valeurs deviennent alors difficilement comparables entre populations (Lee & Zairi 2005, Lacey 2007, Otieno-Ayayo et al. 2008).

Une alternative aux méthodes d'association est **l'approche par « scan génomique »** qui a le grand avantage de ne nécessiter ni croisements, ni a priori sur le phénotype des individus. Dans notre cas, elle permet de comparer soit des populations traitées au *Bti* et non traitées, soit des populations sensibles et résistantes. Cette approche a été développée récemment et a permis de détecter avec succès des régions présentant des signatures de sélection chez l'homme (Smith et al. 1996, Johnson et al. 2001, Voight et al. 2006), les plantes (Tsumura et al. 2007, Meyer et al. 2009), les insectes (Joost et al. 2007, Nosil et al. 2008, Egan et al. 2008), les poissons (Campbell & Bernatchez 2004, Vasemagi et al. 2005), les mollusques (Wilding et al. 2001, Grahame et al. 2006, Wood et al. 2008) ou les batraciens (Bonin et al. 2006). Elle consiste à comparer la distribution du polymorphisme génétique entre les populations, et à rechercher les marqueurs qui sont plus différenciés qu'attendu sous l'hypothèse de neutralité. Ces marqueurs génétiques atypiques sont appelés **marqueurs**

outliers. L'analyse des marqueurs *outliers* est basée sur l'hypothèse que la dérive génétique et la migration sont des forces évolutives qui agissent de la même manière sur tous les locus, alors que la sélection ne concerne que certains gènes impliqués dans l'adaptation. Ainsi, les allèles procurant un avantage sélectif dans un environnement donné seront statistiquement plus fréquents que dans les autres environnements où ils ne seront pas avantagés. A l'inverse, les allèles neutres non soumis à la sélection ne seront pas différenciés entre les environnements. Plusieurs méthodes permettent l'analyse statistique de la distribution de la différenciation génétique (F_{ST}) pour plusieurs centaines de loci et la mise en évidence de loci *outliers* ayant un F_{ST} particulièrement élevé entre populations soumises à sélection divergente (Beaumont & Nichols 1996, Beaumont & Balding 2004, Vitalis 2003, Foll & Gaggiotti 2008). Les marqueurs *outliers* ainsi détectés ne sont pas nécessairement directement impliqués dans l'adaptation, et sont plus probablement liés aux régions chromosomiques sous sélection.

L'évolution très rapide des allèles de résistance après leur apparition dans les populations est une des particularités de la résistance aux pesticides par rapport à de nombreux autres types d'adaptations. Cette évolution particulièrement rapide ne laisse que peu de temps à la recombinaison pour séparer les gènes directement sous sélection des gènes qui leur sont liés (Oakeshott 2003). Pouvoir détecter des traces de sélection sur de grandes régions chromosomiques autour des gènes de résistance est un avantage considérable pour les études criblant aléatoirement le génome. En effet, pour un nombre de marqueurs moléculaires donné, il sera statistiquement plus probable de génotyper par hasard ces régions sous sélection. L'inconvénient cependant, est qu'il est plus difficile de déterminer « le » gène sous sélection lorsque les régions montrant une signature de sélection contiennent plusieurs centaines de milliers de paire de bases et plusieurs dizaines de gènes. Les méthodes de QTL ou de scan génomique nécessitent une bonne couverture du génome et utilisent généralement des centaines de marqueurs moléculaires répartis sur tout le génome et génotypés pour plusieurs centaines d'individus.

V.3- Les marqueurs moléculaires pour les scans génomiques

L'identification de gènes (ou de régions du génome) sélectionnés par une approche génomique des populations nécessite l'utilisation d'un grand nombre de marqueurs moléculaires répartis le plus uniformément possible sur tout le génome. Il s'agit d'avoir une

vision globale de la variabilité du génome. Plusieurs types de marqueurs ont récemment été utilisés pour identifier des allèles sous sélection (Luikart et al. 2003, Nosil et al. 2009), dont notamment les microsatellites, AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism) et SNP (Single Nucleotide Polymorphism).

L'utilisation de **marqueurs microsatellites** présente de nombreux avantages pour les études de génétique des populations car ils sont multialléliques et codominants, ce qui facilite l'utilisation des tests de détection d'*outliers*. Cependant, ils ont l'inconvénient d'être monolocus. Cela veut dire qu'un screening de l'ensemble du génome ne pourra se faire qu'après avoir défini au préalable de nombreux locus microsatellites. Le génotypage doit se faire ensuite locus par locus ou alors par lots de petits nombres de locus (le multiplexage lors de l'amplification n'est réalisable qu'à petite échelle, Armstrong et al. 2000). De plus, le nombre de marqueurs microsatellites dont on dispose ne permet généralement pas de couvrir l'ensemble du génome, notamment chez les espèces non-modèles. Il est à noter que le génome d'*Aedes aegypti* est particulièrement pauvre en microsatellites (Severson et al. 2004).

Les **SNP** correspondent à des mutations ponctuelles sur le génome. Ce sont des marqueurs intéressants bien qu'ils soient mono-locus, car le développement de nouvelles technologies de génotypage permet l'analyse simultanée de plusieurs centaines voir de plusieurs milliers de ces marqueurs (Matsuzaki et al. 2004). Si l'on dispose de plusieurs centaines de SNP, le « screening » du génome est donc possible. Néanmoins, cette approche nécessite une connaissance préalable du génome (séquençage partiel ou complet), avant de pouvoir rechercher des SNP à grande échelle. Cette technique a donc été utilisée chez des organismes modèles et notamment chez l'homme pour la détection de gènes liés à l'expression de maladies génétiques (Teshima et al. 2006, Hampe et al. 2007).

Bien que l'on dispose de la séquence du génome d'*Aedes aegypti*, l'utilisation de marqueurs SNP n'a pas été envisagée pour cette étude. En effet, disposer de la séquence d'une espèce ne permet pas d'obtenir le polymorphisme, et l'identification de nombreux SNPs demande un séquençage massif de nombreuses portions réparties sur l'ensemble du génome et sur plusieurs dizaines d'individus. Ceci ne peut se faire que sur des espèces sur lesquelles l'effort de séquençage est très important. Les avancées récentes de génotypage haut débit vont permettre d'obtenir à moindre coût des milliers de SNP, cependant ces méthodes étaient encore en cours de développement lors de ma thèse.

Chez les espèces non-modèles, on peut révéler le polymorphisme génétique par d'autres méthodes ne nécessitant pas de connaissance préalable du génome. C'est le cas de marqueurs multilocus comme les **AFLP** (Vos et al. 1995). Cette méthode permet de détecter des mutations ponctuelles situées au niveau de sites de coupure d'enzymes de restriction. Bien que les marqueurs AFLP soient bialléliques et dominants (présence/absence d'un fragment de restriction), des méthodes d'analyse pour la détection d'*outliers* prenant en compte ces contraintes sont maintenant disponibles (Beaumont & Nichols 1996, Vitalis 2003, Foll & Gaggiotti 2008). Les AFLP offrent surtout le grand avantage de générer rapidement et à moindre coût un très grand nombre de marqueurs (plusieurs centaines) couvrant l'ensemble du génome. Cela rend ces marqueurs de plus en plus utilisés pour la recherche de gènes sélectionnés chez les espèces non-modèles (Wilding et al. 2001, Campbell & Bernatchez 2004, Bonin et al. 2004, Nosil et al. 2008, Egan et al. 2008, Meyer et al. 2009). Dans notre cas, cette méthode nous a semblée bien adaptée à la recherche des bases génétiques de la résistance au *Bti* chez les moustiques.

Enfin, la **technique DArT** (Diversity Array Technology, Jaccoud et al. 2001) basée sur la technique des AFLP est également prometteuse. Cette technique a été développée pour l'analyse moléculaire de plantes cultivées comme le blé ou l'orge (Jaccoud et al. 2001, Wenzl et al. 2004, Akbari et al. 2006) et peut être appliquée aux espèces animales. Le principe de la méthode DArT est de révéler le polymorphisme de présence/absence de séquences par hybridation du génome d'un individu contre des séquences de référence grâce à des puces à ADN (figure 13). La technique DArT offre de nombreux avantages :

- elle peut permettre de produire des marqueurs liés à des éléments précis dans les génomes, comme les éléments transposables par exemple.
- le nombre de fragments polymorphes étudiés simultanément en routine est beaucoup plus important que pour les AFLP (plusieurs milliers) ce qui offre une meilleure couverture du génome.
- le protocole contient une étape de clonage des fragments. Un séquençage éventuel des fragments polymorphes est donc très facilement réalisable, et moins sensible aux problèmes d'homoplasie de taille que l'on peut rencontrer avec les AFLP.

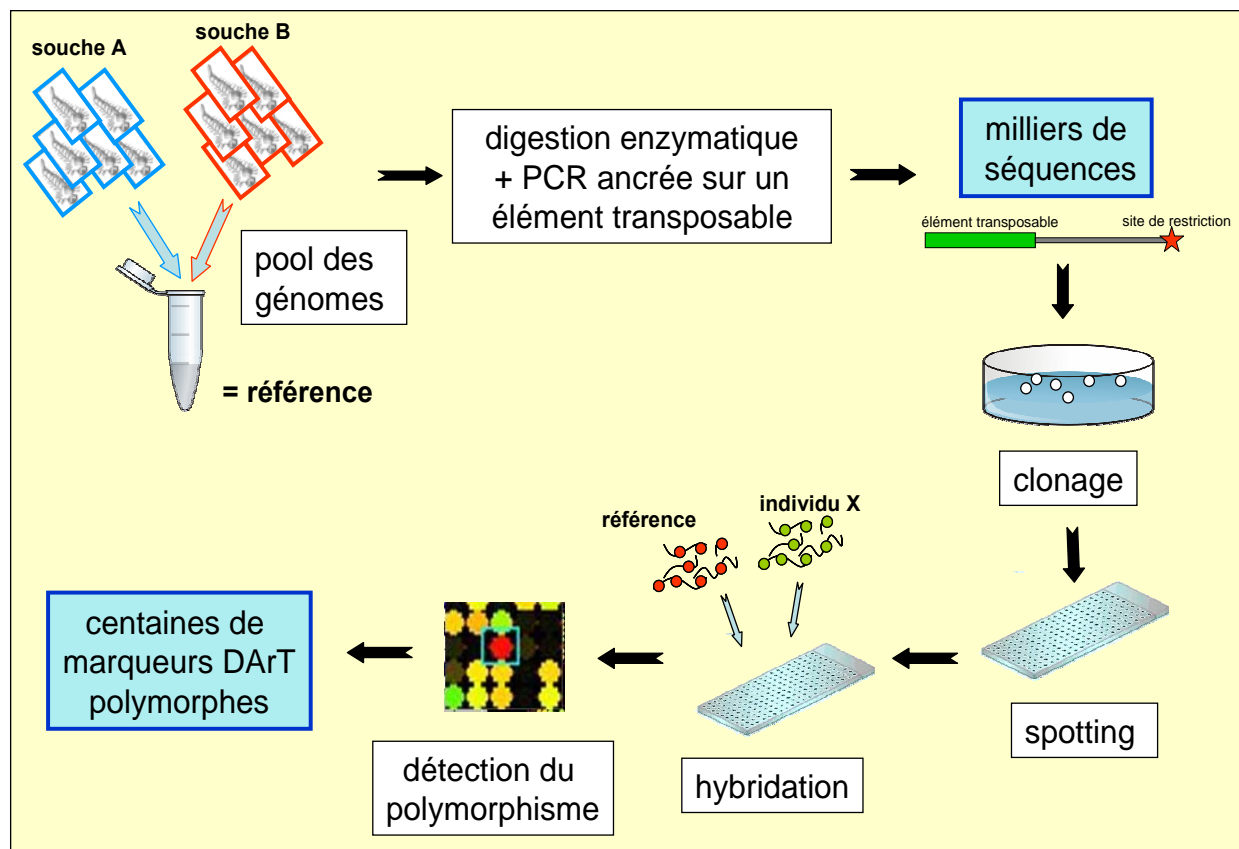


Figure 13 : Obtention de marqueurs DArT liés à un élément transposable.

V.4- Séquençage des loci outliers AFLP

V.4.1- Séquençage par réduction des profils AFLP et isolation sur gel

Le séquençage des fragments représentant les loci *outliers* est nécessaire à leur localisation sur le génome. La méthode AFLP génère un grand nombre de fragments d'ADN, environ une centaine par individu, et il est difficile de séparer les fragments *outliers* des fragments neutres pour les séquencer. Une méthode de réduction du nombre de fragments amplifiés dans un profil AFLP, tout en conservant les fragments *outliers*, peut être utilisée. Elle consiste à déterminer, grâce à des amorces dégénérées, la séquence des 6 premières bases des fragments *outliers*, afin de construire des amorces spécifiques de chacun de ces fragments (Brugmans et al. 2003). Les 3 premières bases sont déterminées par les amorces choisies lors de l'étape d'amplification sélective des AFLP, 12 amorces supplémentaires sont nécessaires à la détermination des 3 nucléotides suivants (tableau 1). Chacune de ces amorces est constituée de la séquence de l'amorce utilisée en AFLP lors de l'amplification sélective, de 3 à 5 bases dégénérées non sélectives (N) et de 1 base sélective (A, C, G ou T). Les 4 premières amorces permettent de déterminer le 4^{ème} nucléotide du fragment AFLP, car seule l'amorce

correspondante à la séquence du fragment peut l'amplifier. Un fragment *outlier* est ainsi amplifié et donne un « pic » lors d'une électrophorèse sur capillaires par seulement 3 de ces 12 amorces, ce qui permet de connaître les 4^{ème}, 5^{ème} et 6^{ème} nucléotides.

Tableau 1 : Séquences des 12 amorces dégénérées utilisées pour la réduction des profils AFLP.

Sequence	
GATGAGTCCTGAGTAA NNNA GATGAGTCCTGAGTAA NNNC GATGAGTCCTGAGTAA NNNG GATGAGTCCTGAGTAA NNNT	pour déterminer le 4^{ème} nucléotide sélectif
GATGAGTCCTGAGTAA NNNNA GATGAGTCCTGAGTAA NNNNC GATGAGTCCTGAGTAA NNNNG GATGAGTCCTGAGTAA NNNNT	pour déterminer le 5^{ème} nucléotide sélectif
GATGAGTCCTGAGTAA NNNNNA GATGAGTCCTGAGTAA NNNNNC GATGAGTCCTGAGTAA NNNNNG GATGAGTCCTGAGTAA NNNNNT	pour déterminer le 6^{ème} nucléotide sélectif

Une fois la séquence des 6 premiers nucléotides sélectifs déterminée, une amorce constituée de 6 bases sélectives permet d'obtenir des profils AFLP avec seulement une dizaine de fragments d'ADN. Une isolation des fragments *outliers* est alors possible, en les découpant directement sur le gel de polyacrylamide après électrophorèse.

V.4.2- Le séquençage haut débit

Les développements récents en matière de séquençage haut débit ont offert de nouvelles perspectives dans les études de métagénomique, génomique, transcriptomique, biologie évolutive ou d'écologie (Sogin et al. 2006, Harkins & Jarvie 2007, Hudson 2008, Ficetola et al. 2008, Gebremedhin et al. 2009, Valentini et al. 2009). Ces méthodes de séquençage haut débit ont ouvert de nouvelles perspectives au cours de ma thèse en ce qui concerne le séquençage des marqueurs AFLP *outliers*. En effet, les séquenceurs comme le 454 (Roche) ou le solexa (Illumina) (Margulies et al. 2005, Eid et al. 2009) permettent de séquencer des fragments d'ADN en mélange, ce qui est le cas des marqueurs AFLP. La possibilité de séquencer les *outliers* AFLP identifiés lors de scans génomiques grâce à ces méthodes offre la perspective d'accéder aux régions du génome ainsi qu'aux gènes impliqués dans la sélection chez les espèces non-modèles.

En résumé : De nombreuses méthodes permettent aujourd'hui de rechercher les bases génétiques de l'adaptation chez les espèces modèles ou non modèles. Les méthodes de « scan génomique » basées sur des marqueurs AFLP ou DArT sont bien adaptées pour la recherche de régions du génome ou de gènes liés à la résistance aux insecticides. Les avancées récentes en matière de séquençage à très haut débit permettent d'accéder aux séquences des *outliers* AFLP chez les espèces non modèles ou d'étudier directement leur transcriptome.

VI- Le coût de la résistance

Si la résistance aux insecticides est avantageuse en présence de l'insecticide, la valeur sélective (fitness) des individus résistants est souvent inférieure à la fitness des individus sensibles en l'absence d'insecticide : cette différence de fitness représente le coût de la résistance.

VI.1- Origine des coûts

Pour expliquer les effets des allèles de résistance sur le reste du phénotype, plusieurs mécanismes sont évoqués dans la littérature (Coustau et al. 2000, Ffrench-Constant et al. 2004, Vila-Aiub et al. 2009).

Lorsque la résistance est due à la mutation du gène ciblé par le pesticide, **la fonction d'origine peut être durablement altérée** (Uyenoyama 1986, Purrington 2000, Ffrench-Constant et al. 2004). Les pesticides ayant pour cible des voies métaboliques de régulation de fonctions majeures dans le fonctionnement des organismes (système nerveux par exemple), la perturbation des processus physiologiques, au sein desquels la protéine cible est directement impliquée, est alors parfois délétère en absence de pesticide.

L'amplification ou la modification de la régulation des gènes codant pour des mécanismes de détoxification entraîne souvent **une surproduction de protéines**. La déviation de ressources limitées vers ces nouveaux mécanismes se fait alors au dépend de fonctions impliquées dans la fitness comme la croissance et/ou la reproduction (Purrington & Bergelson 1999, Werck-Reichhart et al. 2000).

Une autre possibilité expliquant la baisse de la fitness engendrée par un gène de résistance est la **formation de nouvelles protéines ou d'une quantité de protéine devenant toxique** pour l'organisme (Gressel 1986, Purrington 2000). Dans ce cas, les individus résistants doivent éliminer ces protéines et/ou les détoxifier ; ce processus est coûteux en énergie pour l'organisme.

Enfin, les gènes de résistance peuvent **être liés physiquement à des gènes affectant la fitness**. Si l'allèle de résistance est lié à un ou des allèles délétères, la baisse de la fitness est due à la sélection indirecte et à la fixation de ces allèles en même temps que la résistance

(Purrington 2000). Un coût de la résistance, même indirect, peut ainsi être observé dans les populations. En fait, ce mécanisme est plutôt évoqué comme une cause de ‘bruit de fond’ de la mesure expérimentale du ‘vrai’ coût associé à une résistance.

VI.2- Estimation du coût de la résistance

Le constat de la décroissance de la fréquence de la résistance dans certaines populations naturelles affranchies de sélection avec le pesticide semble confirmer l’hypothèse selon laquelle les allèles de résistance peuvent être contre-sélectionnés dans ces conditions environnementales (Lenormand et al. 1999). Cependant, les observations sur le terrain ne permettent pas toujours de corréler cette baisse de fréquence au coût de la résistance car des phénomènes tels que la migration peuvent aussi « diluer » l’allèle de résistance dans une population locale (Lenormand 2002). Deux méthodes principales sont alors appliquées pour mesurer de façon expérimentale le coût sur la fitness associé à la résistance (Lenormand & Raymond 2000, Bourguet et al. 2004, Roux et al. 2005).

La première est **l’étude des changements de fréquence de l’allèle de résistance** dans des populations non traitées soit dans le temps (sur plusieurs générations) ou dans l’espace (suivant l’éloignement aux zones traitées) (Gilliland et al. 1998, Roux et al. 2006, Lenormand & Raymond 2000). Un procédé efficace pour contourner l’influence des flux géniques dans ces études et pour mesurer ainsi l’effet de la sélection naturelle sur les allèles de résistance est alors le confinement en laboratoire. Cependant, ces expérimentations sont lourdes (il faut assez d’individus pour limiter l’effet de la dérive génétique) et longues (de nombreuses générations sont parfois nécessaires pour pouvoir évaluer les changements alléliques au cours du temps).

La seconde méthode est **la comparaison directe des composantes de la fitness** entre des individus résistants et sensibles en absence de traitement (Purrington & Bergelson 1997, Bourguet et al. 2004, Berticat et al. 2008, Gassmann et al. 2009). Les caractères mesurés sont liés à la reproduction, la croissance, le comportement ou la phénologie. Si cette méthode permet souvent de préciser quel caractère est affecté par l’allèle de résistance elle garde le défaut majeur de ne pas nécessairement couvrir l’ensemble des traits affectés conduisant à une estimation peu précise du coût. Les premières démonstrations associant un coût à des gènes de résistance ont été réalisées sur les bactéries et ont permis de détecter des différences dans le

taux d'accroissement entre les souches sensibles et des souches résistantes aux antibiotiques (Bouma & Lenski 1988). Toutes les résistances aux pesticides ne confèrent pas un coût sur la fitness aux individus qui les portent (Tranel & Wright 2002).

VI.3- Variation du coût de la résistance selon l'environnement

La variation des conditions environnementales peut affecter l'amplitude des différences entre la fitness des individus sensibles et résistants (Janmaat et al. 2005). Un environnement stressant ou avec des ressources limitées défavorise en général les individus résistants et accentue le coût sur la fitness de ces individus (Purrington & Bergelson 1997, Kishony & Leibler 2003, Liu et al. 2008, Hardstone et al. 2009). Les études de la fitness sont généralement conduites dans des conditions expérimentales optimales. Or, de telles conditions ne correspondent pas toujours à celles du milieu naturel dans lequel se développent les individus (Bourguet et al. 2004). Les mesures expérimentales de la fitness ne sont donc pas toujours représentatives des valeurs exprimées en population naturelle.

VI.4- Mécanismes de compensation du coût de la résistance

Le coût des effets pléiotropes sur la fitness peut **évoluer dans le temps** grâce à plusieurs mécanismes permettant de le réduire voire de l'éliminer. Ces mécanismes sont très étudiés chez les bactéries et les microorganismes résistants aux antibiotiques (Normark & Normark 2002), mais leur étude demeure rare chez les insectes et les plantes résistants aux pesticides (Guillemaud et al. 1998, Raymond et al. 2001, Labbe et al. 2007). Il a été observé dans plusieurs cas le retour d'un allèle résistant fixé à sa forme sensible d'origine par mutation, en absence de sélection (Levin et al. 2000). La réversion à un phénotype sensible est cependant rarement observée, d'autres mécanismes permettant de réduire le coût étant plus probables statistiquement (Levin et al. 2000, Andersson 2003). Ces mécanismes permettent une réduction du coût sans affecter le niveau de résistance (Bjorkman et al. 2000), voire même en l'améliorant. Par exemple, chez le moustique *Culex pipiens*, un remplacement allélique dans un gène codant pour une estérase a été observé conférant à la fois une meilleure résistance aux organophosphorés et un coût moins élevé que la mutation d'origine (Guillemaud et al. 1998).

Si plusieurs mutations permettent le même degré de résistance, la mutation d'origine conférant un coût sur la fitness peut être **remplacée par une autre mutation** conférant la même résistance à moindre coût (Labbe et al. 2007, 2009). Les mutations alternatives peuvent apparaître au même locus, ce sont des changements alléliques (Cohan et al. 1994, Bjorkman & Andersson 2000). Ces nouvelles mutations permettent en général de rendre les individus résistants sans altérer (ou en altérant peu) la fonction d'origine du gène ciblé (Normark & Normark 2002). Si d'autres remplacements surviennent à des loci différents, ils sont alors appelés remplacements non alléliques (Lenski 1988).

Des mutations de compensation sur d'autres loci peuvent compenser les effets délétères dus à l'allèle de résistance (Schrag et al. 1997, Reynolds 2000, Levin et al. 2000, Andersson 2003). Cette théorie a été émise pour la première fois par Fisher (1928) pour expliquer l'évolution des allèles délétères récessifs. Les mutations de compensation peuvent apparaître potentiellement sur n'importe quel gène qui interagit avec les effets délétères dus au gène de résistance (Cohan et al. 1994). L'augmentation de la fitness par accumulation de mutations de compensation est la plus fréquente, un nombre important de gènes pouvant être touché. Par exemple, les cibles permettant la compensation ont été estimées être 20 fois plus abondantes que celle permettant la réversion chez la bactérie *Salmonella typhimurium* (Andersson 2003). Ces mutations permettant une réduction du coût de la résistance, ne permettent cependant pas une augmentation de la fitness chez les individus sensibles (Bjorkman & Andersson 2000) ce qui favorise le maintien d'un polymorphisme.

Le coût de la résistance peut également varier entre des populations ayant **des fonds génétiques différents** mais aussi entre les individus d'une même population ne différant que de quelques gènes (Roux et al. 2005, Paris et al. 2008). Un allèle de résistance présent dans une population donnée (ayant une diversité génétique élevée) va donc pouvoir sélectionner au cours des générations le fond génétique qui lui est le plus favorable. Le coût d'un allèle de résistance peut ainsi diminuer sans faire intervenir de mécanismes de mutations.

La **conséquence négative de la perte du coût** de la résistance est la fixation de la résistance dans les populations à plus ou moins long terme, même en absence d'agent sélectif (Bjorkman et al. 1998, Schrag et al. 1997). Ensuite, une réduction du coût pourrait déterminer plusieurs phases dans l'évolution de la résistance dans une population: une évolution lente

lors de l'apparition de la résistance due à l'expression du coût des effets pléiotropes sur la fitness, suivie d'un accroissement plus rapide lorsque ce coût a été réduit. La compensation du coût au cours du temps pourrait permettre d'expliquer en partie pourquoi une absence de coût sur la fitness est observée pour de nombreuses résistances.

VI.5- Les études du coût de la résistance aux insecticides

Chez les **moustiques**, de nombreuses mutations conférant une résistance aux insecticides confèrent aussi un coût aux individus qui les portent (De Oliveira *et al.* 2003, Bourguet *et al.* 2004, Berticat *et al.* 2008, Hardstone *et al.* 2009). Les effets pléiotropes des gènes de résistances peuvent s'exprimer sur de nombreux traits tels que le temps de développement, la survie, la fécondité, la taille des ailes ou encore sur le succès reproducteur.

La **résistance aux toxines du *Bt*** est également connue pour altérer la fitness dans la plupart des études mesurant un coût à la résistance en laboratoire ou sur le terrain (voir Gassmann *et al.* 2009 pour une synthèse bibliographique). Les traits d'histoire de vie les plus touchés sont le temps de développement, la survie, la fécondité ou la viabilité des œufs. Des modifications du comportement d'accouplement ont également été observées chez des lépidoptères résistants aux toxines Cry (Zhao *et al.* 2009). L'expression des coûts associés à la résistance aux toxines Cry n'est pas dépendant du mécanisme de résistance. Ainsi les deux mécanismes principaux de résistance (modification des récepteurs et réduction de l'activité des protéases) peuvent ou non impliquer des coûts chez les espèces de lépidoptères résistantes aux toxines du *Bt* (Gassmann *et al.* 2009).

<p>En résumé : Les effets pléiotropes associés à la résistance représentent un bon exemple de compromis adaptatifs. Ils peuvent être estimés 1/ en suivant l'évolution des fréquences alléliques des allèles de résistance en absence d'agent sélectif, ou 2/ en comparant directement les traits d'histoire de vie de souches résistantes et sensibles. Des mécanismes de compensation peuvent apparaître et être sélectionnés au cours du temps afin de réduire les coûts associés aux résistances.</p>

VII- Les flux de gènes chez les populations de moustiques

La connaissance des taux de dispersion des populations de moustiques est primordiale pour estimer le potentiel de propagation des résistances et pour pouvoir mettre en place des stratégies de lutte adaptées (Pates & Curtis 2005, Porretta et al. 2007). De plus, chez les espèces vectrices de maladies, connaître leur distance de dispersion permet d'évaluer et de contrer la propagation de ces maladies (Killeen et al. 2003, Reiter et al. 1995, Reiff et al. 2007). La dispersion naturelle des moustiques dépend principalement de leur capacité de vol, de leurs préférences trophiques et environnementales, de l'environnement (barrières géographiques), ainsi que des conditions météorologiques (vents). De plus, les déplacements humains peuvent entraîner une dispersion accidentelle des moustiques (par avion, bateau, voiture,...).

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour déterminer la dispersion : soit par observation directe des déplacements des moustiques sur le terrain, soit en mesurant de façon indirecte les flux de gènes entre populations grâce à des données génétiques.

VII.1- Observations directes

Des méthodes d'observation directe des mouvements des insectes sur le terrain peuvent être mises en place, principalement grâce **aux marquages d'individus** (Hagler & Jackson 2001). La méthode la plus utilisée consiste au marquage et à la recapture d'individus, avec des pièges plus ou moins éloignés du point d'origine de ces individus. Une dispersion journalière de 50 à 300 m a ainsi été mesurée chez *Aedes aegypti* (Muir & Kay 1998, Harrington et al. 2005, Maciel-De-Freitas et al. 2007), de 50 m chez *Aedes rusticus* (Shafer et al. 1997), de 500 m chez *Aedes albopictus* (Niebylsky & Craig 1994), ou de 600 m chez *Anopheles gambiae* (Costantini et al. 1996, Midega et al. 2007). Chez certaines espèces, la distance de dispersion peut être beaucoup plus élevée: c'est le cas par exemple d'*Anopheles annulipes* dont les adultes peuvent voler jusqu'à 5 kilomètres (Bryan et al. 1991).

VII.2- Observations indirectes grâce à la génétique des populations

L'utilisation de **marqueurs génétiques neutres** permet de mesurer la différenciation génétique (F_{ST}) et d'estimer les flux de gènes entre les populations. Plusieurs études ont ainsi déterminé la structure de populations de moustiques avec différents marqueurs génétiques

comme les allozymes (Urbanelli et al. 2000, David et al. 2003), les AFLP (Yan et al. 1999, Paupy et al. 2004, Merrill et al. 2005), les microsatellites (Michel et al. 2005) ou les SNP (Beck et al. 2005). Pour certaines espèces, les populations sont très structurées et sont composées de nombreux patchs isolés (Paupy et al. 2004, Chen et al. 2004, Merrill et al. 2005, O'Loughlin et al. 2007, Reiff et al. 2007). C'est principalement le cas des populations urbaines de moustiques où les habitats sont très fragmentés, ou des populations insulaires. Par exemple, chez l'espèce urbaine *Aedes aegypti*, des différenciations génétiques élevées sont détectables dans des populations distantes de moins d'un kilomètre, même en l'absence de barrières géographiques (Paupy et al. 2004, Reiter et al. 1995). A l'inverse, pour d'autres espèces, la différenciation génétique entre les populations est faible sur de larges distances géographiques (Lehmann et al. 1997, Beck et al. 2005, Wondji et al. 2005, Porretta et al. 2007). C'est le cas par exemple de l'espèce *Ochlerotatus caspius* ayant pour habitat des rizières italiennes et montrant une structure panmictique sur plus de 400 kilomètres (Porretta et al. 2007).

Il est intéressant de noter que si la structure des populations est conservée suivant le type de marqueurs moléculaires utilisé, les valeurs de F_{ST} peuvent être influencées par ces marqueurs (Paupy et al. 2004). Les biais dans l'estimation des F_{ST} peuvent être dus à des différences de taux de mutation entre les marqueurs ou du nombre de loci analysés (Paupy et al. 2004).

<p>En résumé : Les taux et les distances de migration sont très variables suivant les espèces de moustiques : de quelques mètres seulement à plusieurs centaines de kilomètres. Ils peuvent être estimés grâce à des observations de terrain ou des études de génétiques des populations.</p>

VIII- Objectifs de la thèse et modèles biologiques utilisés

VIII.1- Objectifs et stratégies adoptées

Mon travail de thèse reposait sur 5 objectifs décrits ci-dessous. Chacun de ces objectifs constitue un chapitre de la thèse.

***Objectif 1:** Caractériser la pression de sélection exercée en Rhône-Alpes par le *Bti* rémanent dans l'environnement. L'objectif est d'identifier l'origine du *Bti* qui prolifère dans certaines litières de gîtes à moustiques en Rhône-Alpes et de déterminer s'il est d'origine commerciale ou naturelle. La stratégie a été de caractériser par génotypage les souches de *Bti* récoltées dans les gîtes à moustiques de la région Rhône-Alpes et de les comparer avec des souches naturelles d'origine mondiale et des souches commerciales utilisées en démoustication.

***Objectif 2:** Etudier l'impact de la rémanence du *Bti* dans l'environnement sur l'apparition et l'évolution de la résistance chez les moustiques. Dans ce cas, notre stratégie a été de sélectionner une souche de moustique de laboratoire (*Aedes aegypti*) avec des litières végétales contenant des toxines de *Bti* et de suivre au cours des générations l'évolution de la résistance au *Bti* et aux toxines individuelles du *Bti*.

***Objectif 3:** Rechercher les bases génétiques de la résistance au *Bti*. Afin de rechercher les régions du génome, et les gènes, impliqués dans la résistance, nous avons comparé les génomes et l'expression des gènes entre la souche d'*Aedes aegypti* sélectionnée au laboratoire et la souche sensible.

Pour la comparaison génétique, trois méthodes ont été utilisées. Tout d'abord, deux scans génomiques ont été réalisés afin de déterminer les régions du génome présentant des signatures de sélection : l'un avec des marqueurs génétiques neutres (marqueurs AFLP) et l'autre avec des marqueurs génétiques liés à un élément transposable (marqueurs DArT). Ensuite, la combinaison des résultats de génomes scans avec une approche « gènes candidats » a permis d'obtenir et de travailler sur une liste de gènes potentiellement liés à la résistance au *Bti*.

Enfin, comme la résistance au *Bti* peut aussi résulter d'une modification de la régulation de certains gènes, deux comparaisons du transcriptome entre les souches

sélectionnée et sensible ont été réalisées. Pour cela nous avons utilisé la technologie des puces à ADN, mais aussi une approche basée sur le séquençage à très haut débit de plusieurs millions de fragments de cDNA (LongSAGE couplé au séquençage solexa).

***Objectif 4 : Mesurer le coût de la résistance au *Bti*.** Dans un premier temps, le coût de la résistance au *Bti* a été mesuré en comparant 14 traits d'histoire de vie entre la souche d'*Aedes aegypti* sélectionnée et la souche sensible. L'effet négatif de ces coûts sur l'évolution de la résistance à ensuite été évalué en absence de traitement pendant cinq générations.

***Objectif 5 : Caractériser la résistance des populations de moustiques de terrain en Rhône-Alpes après 20 ans de traitements au *Bti*.** Les objectifs sont de faire un état des lieux de l'évolution de la résistance dans la région Rhône-Alpes, et de mesurer les flux de gènes dans les populations naturelles de moustiques en Rhône-Alpes. Des marqueurs AFLP ont été utilisés pour analyser à l'échelle de la région Rhône-Alpes 13 populations naturelles de l'espèce *Aedes rusticus* traitées ou non avec le *Bti*. La stratégie a été d'utiliser la génomique des populations pour 1/ identifier des régions du génome potentiellement sous sélection et 2/ étudier les flux de gènes chez cette espèce.

VIII.2- Modèles biologiques utilisés

Afin de répondre à ces objectifs, j'ai utilisés plusieurs modèles biologiques.

VIII.2.1- Litières toxiques (objectifs 1 et 2)

Les litières toxiques utilisées pendant ma thèse pour les sélections ou les bioessais ont été collectées en Août 1998 sur le site de Talissieu dans l'Ain. Ces litières sont composées principalement de feuilles d'aulnes glutineux, de peupliers noirs et de chênes pédonculés. Ces litières montrent une très forte toxicité contre les larves de moustiques (David et al. 2000). Après avoir été collectées, les litières ont été séchées, broyées et conservées à -80°C avant leur utilisation.



Figure 14 : Gîte larvaire boisé (à gauche) et ses litières végétales (à droite).

VIII.2.2- *Aedes aegypti* (objectifs 2, 3 et 4)

L'espèce tropicale *Ae. aegypti* (souche Bora Bora) a été utilisée comme espèce modèle de laboratoire pour cette étude (objectifs 2, 3 et 4). Cette souche est particulièrement sensible aux xénobiotiques en général (David et al. 2000). Elle a l'avantage de s'élever facilement en laboratoire avec des temps de génération relativement courts (2 mois environ). *Ae. aegypti* est également une espèce modèle pour de nombreux laboratoires et de nombreuses ressources génétiques sont disponibles : génome entièrement séquencé (Nene et al. 2007) et disponible, puces à ADN (Strode et al. 2008).



Figure 15 : Photographies d'une larve (à gauche) et d'une femelle (à droite) *Aedes aegypti*.

VIII.2.3- *Aedes rusticus* (objectif 5)

Ae. rusticus (Rossi) est une espèce prédominante dans les gîtes préalpins sous une couverture arborescente importante, mais également présente dans les gîtes à végétation mixte, où l'on trouve à la fois des essences arborescentes et herbacées (David et al. 2000, Rey et al. 2000). *Ae. rusticus* est une espèce annuelle possédant un cycle de vie particulier. Contrairement à la plupart des autres espèces de moustiques dont les stades larvaires durent seulement quelques semaines au printemps ou en été, les larves d'*Ae. rusticus* se développent durant les mois d'hiver en eaux froides avant d'émerger au printemps. Les adultes migrent peu et restent proche de leurs gîtes larvaires (Shäfer et al. 1997).



Figure 16 : Exemple d'un gîte larvaire d'*Aedes rusticus* (à gauche) et de larves récoltées lors de l'échantillonnage de cette espèce (à droite).

Chapitre 1- Origine et rémanence du *Bti* dans l'environnement en Rhône-Alpes

I- Présentation de l'étude et principaux résultats

Dans certains sites de la région Rhône-Alpes, les litières végétales des gîtes larvaires montrent une forte toxicité pour les larves de moustique. Pendant plusieurs années, la toxicité des litières végétales a été attribuée à des composés secondaires polyphénoliques contenus dans les plantes. Par la suite, des études complémentaires ont démontré que la toxicité de ces litières végétales était plutôt due à la présence de toxines de *Bti* (article 1 : Tilquin et al. 2008). Grâce à des cultures bactériennes sur des échantillons de terrain, des tests immunologiques et des PCR diagnostiques ciblant spécifiquement les gènes codant pour les protéines du *Bti*, une forte quantité de spores de *Bti* dans les litières toxiques a été mise en évidence. C'est donc la prolifération et l'accumulation de *Bti* dans l'environnement qui est susceptible d'être la cause de la forte toxicité des litières végétales.

Au cours de ma thèse, ma contribution à ce travail a constitué à **déterminer l'origine des souches de *Bti* proliférant dans les litières**. La question était de déterminer si ces souches de bactéries sont autochtones et naturellement présentes dans le milieu ou, si elles proviennent du *Bti* commercial régulièrement épandu dans la région lors des opérations de démoustication. La stratégie adoptée a été de génotyper par des marqueurs AFLP les souches contenues de *Bti* dans les litières toxiques et de les comparer avec des souches naturelles et des souches commerciales. Une collaboration avec l'Institut Pasteur à Paris nous a permis d'obtenir 15 souches de *Bacillus thuringiensis israelensis* provenant du monde entier ainsi que 2 souches de *Bacillus sphaericus*, également utilisé comme bactério-insecticide. Des souches de *Bti* provenant de sites non-traités par les agents de démoustication de la région Rhône-Alpes ont également été isolées et génotypées.

Les 201 marqueurs AFLP polymorphes obtenus ont permis une bonne différenciation génétique entre les souches de bactéries *Bacillus* testées. Les résultats ont permis de déterminer que le *Bti* qui prolifère dans les litières toxiques pour les larves de moustiques est **génétiquement très proche de la souche commerciale** utilisée pour les traitements larvicides et provient très probablement de résidus d'épandage (Article 1 : Tilquin et al.

2008). Des souches identiques aux souches commerciales ont également été détectées dans des gîtes qui n'avaient jamais été traités, mettant en évidence la contamination par les bactéries commerciales sur une grande échelle spatiale.

Les conclusions de cette étude suggèrent que la rémanence et la prolifération du *Bti* dans certains gîtes larvaires à moustiques est susceptible de faciliter l'apparition de la résistance, surtout chez les populations de larves dont les particules de litière végétale constituent la base de l'alimentation. Ainsi, les populations larvaires sont exposées tout au long de leur développement à de faibles doses de *Bti*, ce qui peut favoriser l'apparition et l'évolution de la résistance au *Bti* dans ces populations.

II- Contribution scientifique sous forme d'article

Article 1 : TILQUIN M, PARIS M, REYNAUD S, DESPRES L, RAVANEL P, GEREMIA RA, GURY G (2008). Long-lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* sp. *israelensis* (*Bti*) in mosquito natural habitats. PLoS ONE 3(10): e3432.

Chapitre 1 - Article 1

Long-lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* sp. *israelensis* (Bti) in mosquito natural habitats.

TILQUIN M, PARIS M, REYNAUD S, DESPRES L, RAVANEL P, GEREMIA RA, GURY G

PLoS ONE (2008) 3(10): e3432.

Long Lasting Persistence of *Bacillus thuringiensis* Subsp. *israelensis* (*Bti*) in Mosquito Natural Habitats

Mathieu Tilquin^{1,2}, Margot Paris², Stéphane Reynaud², Laurence Despres², Patrick Ravanel², Roberto A. Geremia^{2*}, Jérôme Gury²

¹ Floralis-UJF Filiale, Gières, France, ² Laboratoire d'Ecologie Alpine (LECA), CNRS UMR 5553, Université Joseph Fourier, Grenoble, France

Abstract

Background: The detrimental effects of chemical insecticides on the environment and human health have led to the call for biological alternatives. Today, one of the most promising solutions is the use of spray formulations based on *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) in insect control programs. As a result, the amounts of *Bti* spread in the environment are expected to increase worldwide, whilst the common belief that commercial *Bti* is easily cleared from the ecosystem has not yet been clearly established.

Methodology/Main Findings: In this study, we aimed to determine the nature and origin of the high toxicity toward mosquito larvae found in decaying leaf litter collected in several natural mosquito breeding sites in the Rhône-Alpes region. From the toxic fraction of the leaf litter, we isolated *B. cereus*-like bacteria that were further characterized as *B. thuringiensis* subsp. *israelensis* using PCR amplification of specific toxin genes. Immunological analysis of these *Bti* strains showed that they belong to the H14 group. We finally used amplified length polymorphism (AFLP) markers to show that the strains isolated from the leaf litter were closely related to those present in the commercial insecticide used for field application, and differed from natural worldwide genotypes.

Conclusions/Significance: Our results raise the issue of the persistence, potential proliferation and environmental accumulation of human-spread *Bti* in natural mosquito habitats. Such *Bti* environmental persistence may lengthen the exposure time of insects to this bio-insecticide, thereby increasing the risk of resistance acquisition in target insects, and of a negative impact on non-target insects.

Citation: Tilquin M, Paris M, Reynaud S, Despres L, Ravanel P, et al. (2008) Long Lasting Persistence of *Bacillus thuringiensis* Subsp. *israelensis* (*Bti*) in Mosquito Natural Habitats. PLoS ONE 3(10): e3432. doi:10.1371/journal.pone.0003432

Editor: Niyaz Ahmed, Centre for DNA Fingerprinting and Diagnostics, India

Received: June 24, 2008; **Accepted:** September 12, 2008; **Published:** October 20, 2008

Copyright: © 2008 Tilquin et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported financially by Floralis, UJF filiale, Région Rhone-Alpes (grant 0501545401 to L.D.) and Démoustication Rhone-Alpes (Collaborative research grant to M.P. and L.D.). Mathieu Tilquin was supported by the Grant 0501545401 from Floralis, UJF Filiale, Rhone Alpes région. Jérôme Gury was supported by the TOXNUC program. The agency Démoustication Rhone Alpes provided financial support but also data (date, sites and times) on *Bti* spraying.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: roberto.geremia@ujf-grenoble.fr

Introduction

Since the fifties, the massive use of chemical insecticides in insect control programs, although very effective in most cases, has led to serious environmental problems, including the long-term persistence of the toxicity in the environment, leading to the acquisition of resistance in exposed insects [1]. Over the past decades, the trend has been towards a reduction in the use of chemical insecticides, progressively replaced by emerging environment-friendly pesticides such as bacterio-insecticides, strongly recommended by the World Health Organization [2].

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* (*Bti*) is one of the most famous spore forming bacterium, able to produce specific insecticidal toxins during sporulation [3]. The toxin is a combination of six main proteins aggregated into a solid crystal encased in the bacterial cell [4], exhibiting acute toxicity towards dipteran insects such as larval mosquitoes and black flies. Today, this bacterium is widely used for the preparation of commercial bio-insecticides [5] used in insect control programs.

The main advantage of *Bti* over chemical insecticides is its highly specific activity towards dipteran insects, due to the presence of

membrane receptors in the insect gut serving as targets for the bacterial toxins [3,6,7]. Due to the absence of such receptors in vertebrates, the *Bti* is considered safe for human health [8]. It was claimed that the toxins and spores were not persistent in the environment with virtually no residual effects, even in environments submitted to seasonal applications [3,9]. Furthermore, almost no dispersion of the spores was observed in the soil [10–12], and contamination of ground water seems very unlikely [13,14]. Finally, due to the complex structure of *Bti* toxins, many authors emphasized that the acquisition of resistance in exposed insects would require multiple mutations at different loci, and is therefore largely delayed under natural conditions [15–17].

For these reasons, the use of *Bacillus thuringiensis* based insecticides in pest control programs is now considered as a viable strategy, which has proven to be both safe and reliable over the last 40 years [18–20].

The growing importance of bacterio-insecticides in insect control activities has encouraged many research programs aiming to discover new bacterial strains with improved insecticidal properties.

In 2000, David et al. reported the presence of highly toxic leaf litter in forest mosquito breeding sites [21]. Due to the acute lethal

effects measured on larval *Aedes aegypti*, and the urgent need for new insecticidal molecules, considerable efforts were made to isolate and identify the compounds responsible for the leaf litter toxicity [22–25]. This led to the development of a laboratory process for synthesizing toxicity from non-toxic decomposed leaf litter. In this article we present the molecular and immunological proof that the high toxicity of leaf litter relies on the persistence of *Bti* spores in natural mosquito habitats. Furthermore, the presence of *Bti* viable spores in untreated areas raises concerns regarding the ecological consequences of massive bacterio-insecticides spreading on a regional scale.

Results

Identification of *Bti* in toxic and non-toxic leaf litter

Different leaf litter samples were tested for *in vitro* reconstitution of the toxicity (table 1 and Figure 1). None of these leaf litter samples were toxic *per se*, however all of them produced toxicity *in vitro* after the laboratory process described in table 2. The vegetation type did not seem to have an influence on toxicity production, neither did the year of collection. Samples originating from both treated and untreated areas were able to generate toxicity *in vitro*. The insecticidal efficacy of the toxin synthesized during the *in vitro* process was measured in bioassays, using larvae of the mosquito *Aedes aegypti* as a standard organism. An LC_{50} of 0.02 mg l^{-1} was obtained for this toxin, comparable to those for *Bti* [26].

In order to better understand the mechanisms involved in the *in vitro* synthesis of toxicity, different experimental conditions were tested. Those with the most significant effect on the production of toxicity are summarized in table 2. Heat shock (70°C) was necessary to obtain toxicity whereas 100°C or $0.22 \mu\text{m}$ filtration treatments prevented it. The last step of the process consists in incubating the extract at 25°C over 72 h. The extract becomes turbid and a toxic pellet is formed. All these results suggest that a micro-organism is involved in leaf litter toxicity.

The presence of microorganisms was investigated by plating aliquots of the leaf litter extracts on LB agar plates. From the different isolated bacteria, it was possible to synthesize toxicity when grown in either LB medium, or sterile leaf litter extract medium. The involvement of this bacterium in producing toxicity was confirmed by its presence in all leaf litter samples previously identified as “toxicity producing”. This bacterium is $5 \mu\text{m}$ long, Gram-positive, rod-shaped and spore-forming (Figure 2A). The

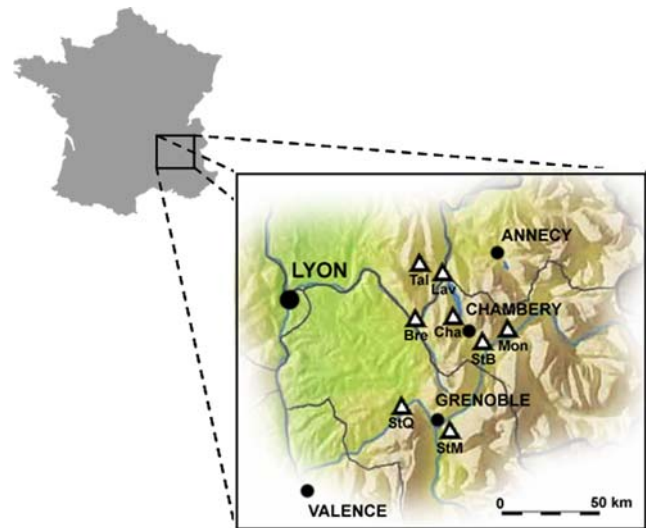


Figure 1. Map of sampling sites in the Rhône-Alps region (France). Each triangle corresponds to a sampling area. All of them are humid mosquito breeding areas (natural forests or swamps) except for the StM site, which is an artificial urban site intended for leaves storage. doi:10.1371/journal.pone.0003432.g001

phase-contrast microscopy revealed the presence of a parasporal inclusion in sporulating cells. This microscopic evidence together with the insecticidal capacity of the bacteria, matched the criteria for the *Bacillus cereus* group. The affiliation to the *Bacillus cereus* group was further confirmed by the sequencing of the 16S rRNA gene, resulting in 100% homology with 16S rRNA sequences available in GenBank for this species group (data not shown). The complete determination was adapted from Ben-Dov et al. [27] by using specific primers for different toxin-coding genes (table 3). The strain was positive for six genes, namely *cyt1*, *cyt2*, *cry4A* and *B*, *cry10* and *cry11* respectively. According to the literature, this combination of genes is typically found in the bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, and the absence of *cry1* and *cry8* genes (serving as controls) supported the determination (see Figure S1). In addition, the 300 bp *Cry11* PCR fragment was sequenced and resulted in a 100% match with *Bacillus thuringiensis israelensis* (GeneId: 5759849, [28]). A final identification method based on immunofluorescence with antibodies specific to flagellar proteins

Table 1. description of the eight sampling sites where decaying leaf litter were collected.

Site	Type	Occurrence of treatment ^a	Dominant species	Year of sampling	Toxicity <i>in vitro</i> ^b
Tal (1)	Forest	treated	<i>Alnus glutinosa</i> , <i>Fraxinus excelsior</i>	2002, 2003, 2005	+
Lav (2)	Forest	treated	<i>Alnus glutinosa</i> , <i>Fraxinus excelsior</i>	2002, 2003, 2005	+
Bre (3)	Forest	treated	<i>Alnus glutinosa</i> , <i>Quercus robur</i>	2002, 2003	+
Mon (4)	Forest	treated	<i>Alnus glutinosa</i> , <i>Alnus incana</i>	2002	+
StQ (5)	Forest	treated	<i>Alnus glutinosa</i>	2002	+
StB (6)	Forest	untreated	<i>Alnus glutinosa</i> , <i>Fraxinus excelsior</i>	2006	+
Cha (7)	Swamp	treated	<i>Carex</i> sp.	2002	+
StM (8)	Artificial	untreated	<i>Populus nigra</i>	2005, 2006	+

^aThe sites referred to as “treated” correspond to mosquito breeding sites where annual spreading of the insecticide *Bti* occurred for more than ten years. No *Bti* treatment was ever applied in “untreated” areas.

^bThe leaf litter samples were submitted to the 3-step process for *in vitro* synthesis of the toxicity: when more than 80% mortality was obtained in the bioassays for at least two leaf litter samples from the same site, the columns were referred to as “+”.

doi:10.1371/journal.pone.0003432.t001

Table 2. Experimental conditions for the in vitro synthesis of toxicity.

Treatment	Modality	Toxicity ^a
	without	–
Heat shock (10 min)	70°C	+
	100°C	–
Sterilization	with	–
(0.2 µm filtration)	without	+
Incubation (3 days)	25°C	+
	5°C	–

^aDifferent treatment modalities were tested on the leaf litter extract and the toxicity produced under these conditions was measured by standard bioassays on *Aedes aegypti* larvae (at least 80% mortality: marked "+"; under 5% mortality: marked "–").

doi:10.1371/journal.pone.0003432.t002

was used to determine the serotype of the isolated strains. The bacteria isolated from commercial *Bti* known to be of the H14 serotype, were marked with fluorescence (green) whilst no reaction was observed for closely-related serotypes such as H12 and H13 (Figure 2B). This result confirmed the specificity of the flagellar antibody and therefore, the fluorescence observed for the bacteria isolated from toxic and non-toxic leaf litter made it possible to establish them as having an H14 serotype.

Besides the non-toxic leaf litter, we focused on particular leaf litter samples collected at one of our sampling sites in 1998, which

were highly toxic *per se* (referred to as "toxic leaf litter"). Figure 3 shows the number of viable spores of *Bti* per gram of dry matter, counted in either non-toxic (6 samples) or toxic (3 samples) leaf litter samples. The mean number of viable spores in toxic leaf litter was about 400 times that in non-toxic samples. Depending on the sample, up to 300,000 spores per gram were counted in toxic leaf litter, indicating a high bacterial load for these samples.

Of all the colonies isolated from toxic leaf litter, PCR amplifications revealed that more than 90% could be identified as *Bti* (positive to *cyt1* and 2, *cry4A* and 4B, *cry10* and *cry11* genes, data not shown).

We also investigated using a more direct method for detecting the bacteria in field collected leaf litter that does not require the isolation of the bacteria on agar plates. The genes encoding *Bti* toxins Cry4A, 4B and Cry11 were directly sought by PCR in the total DNA pool extracted and purified from leaf litter material (Figure 4). For toxic leaf litter, only one run of 31 PCR amplification cycles was sufficient for *Bti* diagnostic, whereas two runs were required to amplify diagnostic *Bti* genes from non toxic litter.

Origin of the *Bti* found in natural habitats

Some of the sampled sites were regularly sprayed with commercial *Bti*, by the local mosquito control agency, raising the question of the origin of the *Bti* strains found in leaf litter (natural vs human-spread). A total of 201 polymorphic markers ranging in size from 67 to 522 pb were successfully scored with the two primer combinations used. The genotyping error rate per locus has been calculated as the ratio between the observed number of differences and the total number of comparisons across the duplicated samples [29]. The seven duplicates were highly

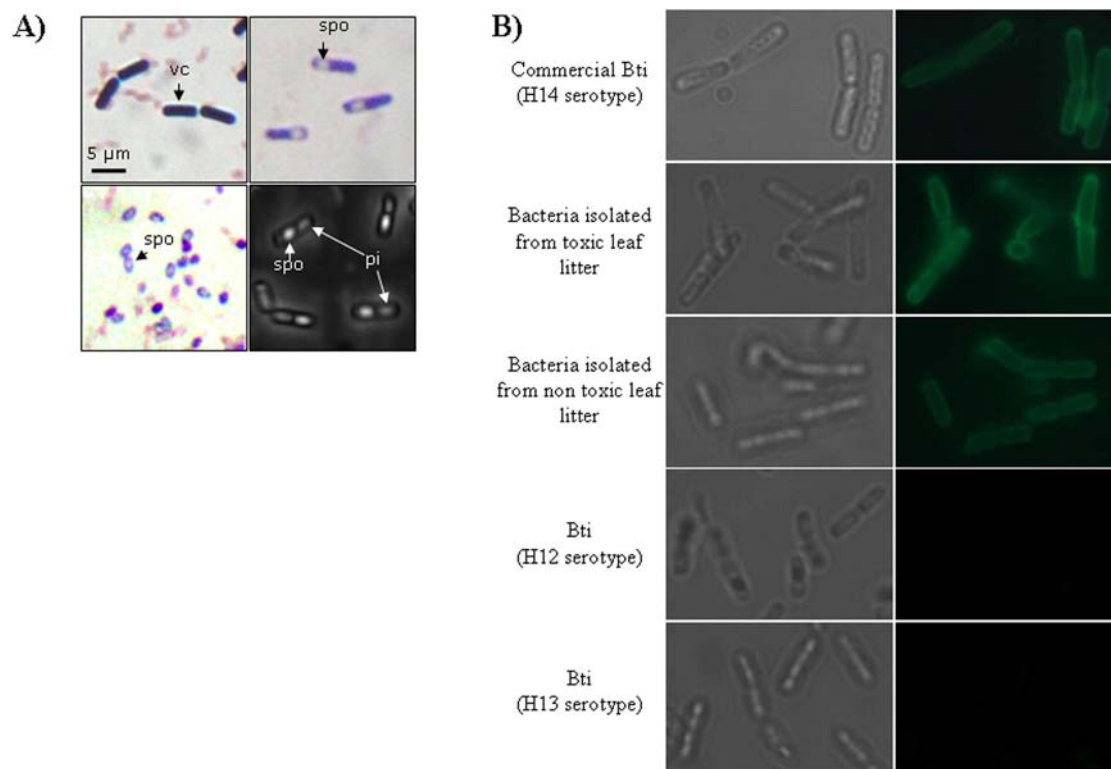


Figure 2. Microscopic observations of different *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains. A) Oil immersion microscopy observation of the vegetative cells (vc) and spores (spo) after Gram staining of isolated toxic bacterium of leaf litter. The parasporal inclusions (pi) were observed by phase contrast microscopy. B) Fluorescent microscopy serotype analysis of *Bti* isolated from toxic or non toxic leaf litter. Bacilli were stained with rabbit antiserum specific for flagellar H14 serotype. Rabbit antibodies were revealed with FITC-conjugated goat anti rabbit Ig.

doi:10.1371/journal.pone.0003432.g002

Table 3. Primers used for PCR amplification.

Primer pair	Anneal temp (°C)	Sequence ^a	Reference
1492r (16 s RNA)	50	5' TACGGTTACCTTGTTACGACTT (r)	[57]
27f (16 s RNA)	50	5' AGAGTTTGATCMTGGCTCAG (d)	[57]
cry1gral	52	5' CTGGATTACAGGTGGGATAT (d), 5' TGAGTCGCTTCGCATATTTGACT (r)	[58]
cyt1gral	52	5' CCTCAATCAACAGCAAGGGTTATT (d), 5' TGCAAACAGGACATTGTATGTGTAATT (r)	[59]
cyt2gral	50	5' ATTACAAATTGCAAATGGTATTCC (d), 5' TTTCAACATCCACAGTAATTTCAAATGC (r)	[59]
cry4Aspe	50	5' TCAAAGATCATTCAAATTTACATG (d)	[59]
cry4Bspe		5' GTTTTCAAGACCTAATAATATAATACC (d), 5' CGGCTTGATCTATGTCATAATCTGT (r)	[59]
cry8gral	49	5' ATGAGTCCAAATAATCTAAATG (d), 5' TTTGATTAATGAGTTCTTCCACTCG (r)	[58]
cry10spe	51	5' TCAATGCTCCATCCAATG (d), 5' CTTGTATAGGCCTTCCTCCG (r)	[59]
cry11gral	51	5' TTAGAAGATACGCCAGATCAAGC (d), 5' CATTGTACTTGAAGTTGTAATCCC (r)	[58]

^ad and r, direct and reverse primers, respectively.
doi:10.1371/journal.pone.0003432.t003

reproducible (99.85%). Among the 23 strains genotyped, the toxic litter sample StM and the commercial strain WG1 presented the same AFLP profiles. All the others strains presented different profiles. Among the *Bti* H14 strains, 52 out of 201 markers (25.8%) were polymorphic. Eighteen markers were diagnostic for *B. sphaericus* strains (i.e. markers always detected in *Bs* and never in *Bti* strains) and eight for *Bti* strains. No diagnostic marker was associated with *Bti* H14 leaf litter strains, or *Bti* H14 commercial strains, or *Bti* H14 natural worldwide strains.

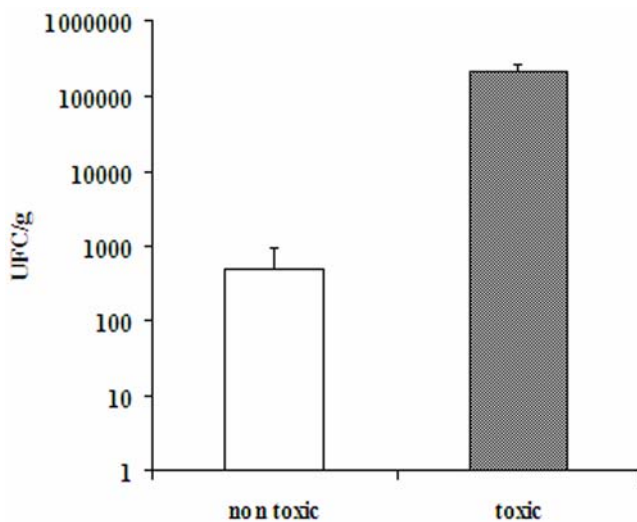


Figure 3. Counts in leaf litter samples of viable spores of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* expressed as number of UFC per gram of dry matter (mean ± SE, log scale). The bars correspond to the standard error calculated from six samples of non-toxic leaf litter and three samples of toxic leaf litter.
doi:10.1371/journal.pone.0003432.g003

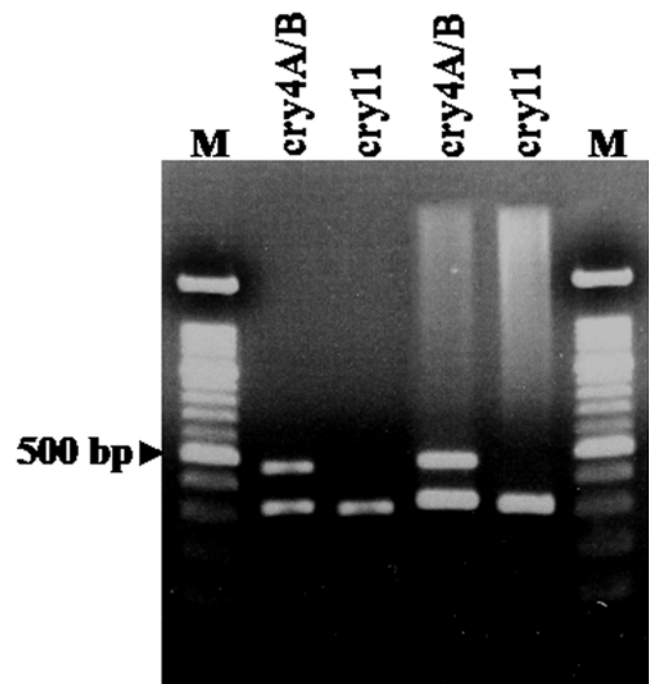


Figure 4. Agarose gel electrophoresis of the PCR products obtained with the DNA extracted from toxic leaf litter. The total DNA was extracted and purified from toxic leaf litter samples and the *cry 4A*, *cry4B* and *cry11* genes were sought by PCR using the corresponding primers. The PCR products detected from toxic leaf litter (lanes 2 and 3) were compared to those obtained from the isolated bacterium serving as a control (lanes 4 and 5).
doi:10.1371/journal.pone.0003432.g004

Pairwise Jaccard distance coefficients among strains varied from 0 (Tal1 vs. WG2) to 0.95 (S05 vs. S05_201) with an overall mean of 0.58 ± 0.29 . Interspecific average distance (*B. shaenicus* vs. *Bti*) was 0.92 ± 0.01 . For the *Bti* strains, a mean distance of 0.81 ± 0.03 was found between different serotypes, and a mean distance of 0.29 ± 0.10 was found between strains within the H14 serotype. Within the H14

group, the mean distance was 0.17 ± 0.07 between commercial and leaf litter strains, 0.33 ± 0.8 between natural and leaf litter strains, and 0.32 ± 0.8 between natural and commercial strains.

The UPGMA dendrogram based on Jaccard distance clearly grouped all the H14 serotype strains together (Figure 5). Within this group, all the strains isolated from the commercial *Bti* were

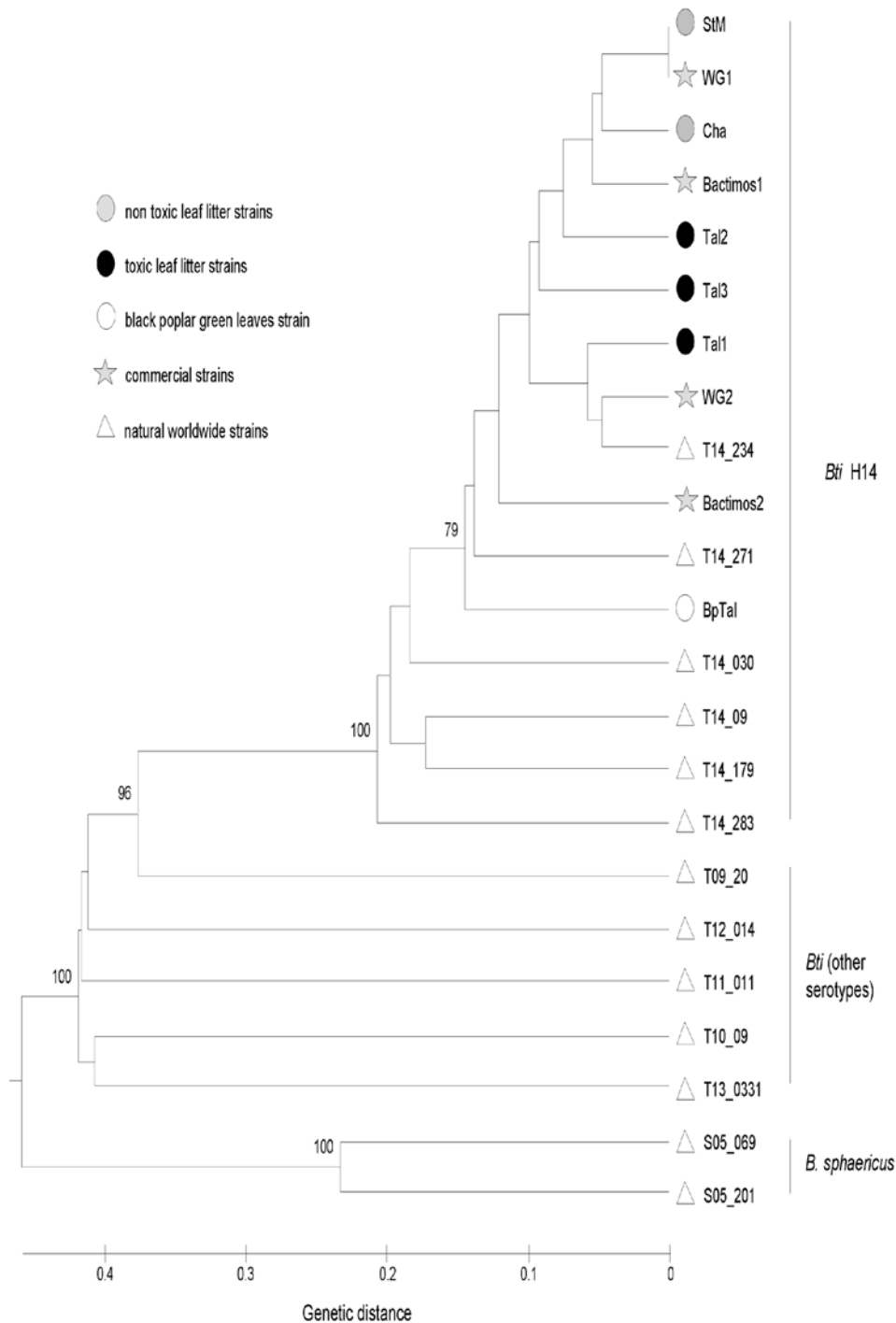


Figure 5. Dendrogram based on the AFLP profiles (201 polymorphic markers) from 21 *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* strains (6 serovars) and 2 *Bacillus sphaericus* strains. Genetic distance between AFLP profiles was calculated by using Jaccard distance. Bootstrapped data set were generated using PHYLTOOLS (1,000 replicates) and analyzed by using the UPGMA clustering method (PHYLIP package V3.5). Only bootstrap values more than 70% are represented. doi:10.1371/journal.pone.0003432.g005

intermixed with strains isolated from toxic and non-toxic litter, and there was one natural strain from the IP collection collected in 1991 in Nigeria. All the other natural *Bti* strains were more distant. Analysis of molecular variance showed a significant genetic differentiation between the group encompassing all the commercial strains and the non-toxic and toxic litter, and the group containing all the worldwide natural strains and the strain isolated from green leaves at a Rhône-Alps site ($P < 0.0001$). It therefore appears that *Bti* isolated from green leaves is more closely related to natural worldwide strains than to commercial *Bti*.

Discussion

Bti belongs to the *Bacillus thuringiensis* species that is usually isolated from the soil but can also be found in many other habitats such like insects (where it proliferates), stored grains, and the phylloplane of plants [30–32] although it was described as a poor colonist of leaf surfaces [33].

Contrary to our observations, *Bti* is generally absent from untreated areas [33]. Some authors excluded the possibility of *Bti* accumulation in treated areas, even when submitted to pluri-annual treatments [34,35]. Actually, even if they were able to persist in soils, the spores of *Bti* have never been seen to germinate and proliferate in this compartment where, on the contrary, they tend to be gradually inactivated [34,36]. In our study, not only was *Bti* found in two untreated sites, but it was also detected at high levels in some samples associated with an acute toxicity towards mosquito larvae. The high *Bti* content, estimated by the number of viable spores, appeared to strongly correlate to the toxicity of the leaf litter samples. To the best of our knowledge, no reference to such residual toxicity in relation to *Bti* accumulation has been made in the literature so far.

The originality of our work lies in the type of samples analyzed. Whereas most of the studies addressing the question of *Bti* occurrence in the environment deal with soil or water samples, we focused on decaying leaf litter, the natural habitat of mosquito larvae. In light of our results, it seems that decaying leaves represent a specific microhabitat in which *Bti* is more likely to persist and potentially grow than in soils. The spores and toxins may be protected from degradation by the vegetal matrix, which makes accumulation processes possible. Although unusual, the germination of *Bacilli* spores in microhabitats other than soils has already been suggested. So far, even if able to persist in soils, the spores of *Bti* were never observed to germinate and proliferate in this compartment where, on the contrary, they tend to be gradually inactivated [34] especially in an environment with high organic matter content. Since the site where the toxic leaf litter was collected was submitted to a single *Bti* treatment during the year 1998, the elevated number of spores (300,000 spores per gram of dry matter) is unlikely to be due to accumulation only. The possibility that the bacteria germinate and proliferate in the natural habitat must not be excluded. Indeed, the germination of spores of *B. thuringiensis* subsp. *kurstaki* was detected in natural conditions, in the rhizosphere and in the gut of insects collected in their habitat [37]. The question arises about the biotic and abiotic conditions that allowed persistence and proliferation of *Bti* in this particular breeding site in comparison with the others. Further investigations would be necessary to fully characterize sites factors such as soil composition, pH, temperature, ultraviolet exposition and insect diversity. In a first attempt to characterize the abiotic conditions of the Rhône-Alps mosquito breeding sites, our investigations on the vegetation and the soil revealed lower oxygen levels in the site where toxic material was collected (Tilquin M., unpublished results). A study of the leaf litter decomposition rates

over a year confirmed this observation, and showed that the processing of organic matter was significantly slower in the “toxic site”, causing the leaves to remain on the ground for a longer time period (data not shown). These observations suggest that under these particular conditions (low oxygen level and low leaf litter decomposition rate), the *Bti* had more time to colonize the leaf litter material, or/and was less affected by degradation than in the other sites.

Tools and methods for the study of bacterio-insecticides in the environment

In this work, we have adapted several tools that have proved to be reliable and to offer interesting opportunities to study of the fate and behavior of bacterio-insecticides in the environment.

Our selective laboratory protocol in conjunction with toxicological bioassays on mosquitoes allows the detection of bacteria exhibiting insecticidal properties.

In addition to its simplicity, the main interest of the protocol lies in the selection of spore-forming organisms by means of the heat shock treatment, considerably reducing the number of microorganisms to be studied. The possibility of selecting interesting candidates among the great diversity of microorganisms encountered in natural substrates such as leaf litter or soil appears to be a valuable advantage. This protocol could therefore be used as an efficient tool to search for the compartments of the ecosystem where bacteria exhibiting insecticidal properties are present, even at low levels.

In addition to the toxicological approach, microscopic and molecular cues can also be obtained from this protocol. As shown in this study, the presence of *Bacillus cereus*-like (*Bc*-like) colonies is easily revealed by plating the heat-shocked extracts on agar plates.

Once isolated on a solid medium, the counting of *Bc*-like colonies appears to be a reproducible method for the quantification of the bacterial population from our samples. In our case, substantial differences in terms of bacterial load were observed between toxic and non-toxic leaf litter.

The microscopic observations of the colonies, revealing the presence of spores and parasporal inclusions in the vegetative cells, supported our toxicological results.

Finally, the PCR amplification of *cyt* and *cry* genes, coupled with immunoassays with flagellar antibodies, clearly identified the isolated organisms, up to the strain level.

The AFLP fingerprinting method has already proven to be a useful tool in bacterial phylogenetics [38,39], species identification [40,41] or epidemiologic studies [42,43]. AFLP was also used successfully to detect molecular variability between highly closely related bacterial strains [44–46]. If previous studies analysed the diversity between different *B. thuringiensis* subspecies [47], to our knowledge, no comparative analyses have been performed between strains within the subspecies *israelensis* so far. In this study, AFLP revealed high polymorphism and allowed to easily discriminate six *Bti* serotypes.

In addition, sufficient genetic diversity was detected between the *Bti* strains within H14 serotype to distinguish between commercial and natural strains, and to identify the origin of leaf litter *Bti*. As AFLP is highly reproducible and highly discriminatory at the strain level, it could be the method of choice for the molecular characterization of *Bti* strains.

This type of multi-step method can easily be used to study *Bti* spread by man in various natural substrates, and to screen new strains of insecticidal bacteria.

Another interesting result of this work is the possibility of detecting bacterial DNA directly from the vegetal sample, without a prior isolation of the bacteria on agar plate (Figure 4). By

reducing the number of laboratory stages required, and allowing the use of high throughput tools for the detection of the target micro-organism, this simple protocol provides interesting perspectives for the study of bacterio-insecticides in the environment. Furthermore, our results have shown that this method is sensitive enough to reveal quantitative differences between samples. We are currently adapting the quantitative PCR method to the detection and precise quantification of bacterial DNA in leaf litter samples. Bioassays and molecular detection by PCR represent an alternative method to western blot and ELISA techniques. Immunodetection requires *Bti* toxin purification and specific antibodies. These methods are time consuming and not suited for high-throughput environmental sample analyses, as the solubilization and purification of toxins from leaf litter of various origins is likely to be difficult to standardize.

The anthropogenic origin of the *Bti* found in natural habitats

AFLP data obtained with the two selective primer combinations was high quality and revealed sufficient levels of polymorphism for non-ambiguous species and serotype identification, and for strain comparisons within the serotype H14. Indeed, the high level of genetic diversity observed between *Bti* strains was essential to effectively characterize the origin of sampled strains.

Although the *B. cereus* group is described as taxonomically confusing, with no phylogenetic differentiation between *B. thuringiensis* and *B. cereus* at the species level [38,45], our AFLP data showed unambiguous differentiation between the 2 species *B. sphaericus* and *B. thuringiensis*. The clustering analyses also indicated a clear phylogenetic signal at the serotype level within the subspecies *B. thuringiensis* subsp. *israelensis*.

All the commercial and Pasteur Institute collection H14 *Bti* strains are grouped in a same cluster, indicating good discrimination of the serotype status of *Bti* strains using AFLP methods. The Rhone-Alps strains also grouped in the H14 *Bti* cluster, confirming the toxicological and immunological results. All the toxic and non toxic leaf litter strains were more closely-related to commercial strain than to worldwide natural strains. In addition, a non toxic leaf litter strain presented the same AFLP profiles as the Vectobac WG *Bti* commercial strain used in the Rhone-Alps region. These results strongly support the anthropogenic origin of the *Bti* found in treated and untreated areas, i.e., that spraying residues can persist and disseminate out from the spraying zone.

The presence of *Bti* strains that are genetically undistinguishable from commercial *Bti* strains at sites which have never been treated is a remarkable and unexpected result, and a wider sampling design would be required to confirm this finding. The very sensitive and reproducible methods developed in our work will be of great use for such wide-scale monitoring of treated and untreated sites on a regional scale.

Conclusion

These results support previous work showing that the persistence of acute toxicity several months after *Bti* spraying are exceptional, as this was only observed on one of the eight sites analyzed. However, we identified the presence of viable *Bti* spores at all the other sites, including one site that had never been treated, suggesting that *Bti* regular spraying of some target sites may have a greater impact than previously thought on regional scale (Rhône-Alps region, about 3000 km²). The impact of such uncontrolled *Bti* residue on natural insect populations is a cause for concern, especially since leaf litter represents the main source of food for mosquito larvae. In case of *Bti*-persistence in leaf litter, mosquito larvae are exposed to *Bti* toxins throughout their whole

development, even at low doses. Such repeated exposition can be considered as a typical selection pressure promoting resistance emergence in mosquito populations. Indeed, a previous study showed that mortality of *Aedes rusticus* to toxic-leaf-litter (containing *Bti*) was lower for larvae sampled in sites which were *Bti*-treated for more than 2 years [48] as compared to untreated sites. Furthermore, a recent article reported significant differences in the sensitivity of mosquito populations to insecticides in relation to *Bti* applications in wetland Rhône-Alps areas [49]. Given the increasing importance of bacterio-insecticides in general, and *Bti* in particular, in insect control programs, there is an urgent need to compile data on the fate and behavior of bacterio-insecticides in the environment. In this work, we highlighted some potential disorders in relation to *Bti* spreading, and we are currently focusing our research on the improvement of the methodology to ensure the rapid and accurate quantification of bacterial DNA in leaf litter samples. Our aim is to initiate a larger sampling campaign to monitor the behavior of *Bti* populations in different conditions for the application of insecticide, and different ecological situations.

Materials and Methods

Sampling sites and leaf litter collection

The leaf litter were collected between July and August 4 to 10 weeks after *Bti* treatment in eight sites in the Rhône-Alps region (Figure 1) between 2002 and 2006. At each location, ten samples of leaf litter (approximately 100 g of fresh matter) were randomly collected in the organic layer (OL). The samples were air dried at 30°C, powdered on a 0.5 mm mesh, carefully homogenized, and stored at −80°C in individual sterile flasks until use. All the samples were compared for their mosquito larvicidal activities to a toxic *per-se* leaf-litter [50]. This toxic litter was collected in August 1998 (site Tal), 4 months after a single *Bti* treatment application at the beginning of spring. In this particular site, a monthly increase (from spring to the end of summer) of leaf litter toxicity was observed for several consecutive years (1996–1998) [50].

The three-step process for the synthesis of toxicity

Each leaf litter sample was used for the *in vitro* synthesis of the toxicity in the 3-step process developed by Tilquin *et al* [22]. Briefly, 200 mg of powdered leaf litter was stirred into 40 ml of sterile Na/K phosphate buffer (25 mM, pH 7.5) for 1 hr at 25°C (step 1: extraction). The leaf litter residue was discarded by filtration through Whatman # 2 after a short centrifugation (5 000 rpm for 5 minutes), and the collected extract was immediately heat shocked for 30 minutes at 70°C (step 2: heat shock), followed by centrifugation to remove all solid residue (15 min at 5 000 rpm). The collected soluble extract was incubated for 72 hrs at 25°C in sterile glass vials (step 3: incubation). During the incubation step, an insoluble fraction appeared in the extract. This precipitate was collected at the end of the incubation by centrifugation (30 min at 5 000 rpm), water rinsed with 5 ml of distilled water (re-suspended and centrifuged 5 min at 5 000 rpm) and immediately used for toxicological bioassays. All extractions were performed in triplicate.

Toxicological bioassays

The toxicity of the precipitate was tested using a standard bioassay procedure on *Aedes aegypti* mosquito larvae as a reference [51]. This bioassay used 20 size-calibrated fourth instar larvae kept in a disposable vial containing 50 ml of tap water at 25°C. The precipitate collected after the third step of the synthesis process was re-suspended in 6 ml of distilled water by pipetting up and

down, and the larvae were dosed with 2 ml of suspension. Each bioassay was performed in triplicate. Larval mortality was counted after two hrs of contact, and the toxicity of the tested material was expressed in % mortality.

The same bioassay protocol was used to determine the LC₅₀ of the precipitate (i.e. concentration generating 50% mortality in the bioassays). An important amount of toxic precipitate was prepared by standard extractions (as described above) and re-suspended in distilled water. An aliquot of the suspension was filtered on a 0.22 µm Whatman filter previously weighed on a precision balance. The filter was then dried until no mass loss was observed, and weighed again to determine the mass of the precipitate. This value was then used to calculate de concentration of the suspension, and to prepare the bioassay media at different concentrations (ranging from 0.001 to 1 mg/l). The bioassays were conducted at 25°C in triplicate, and larval mortality was monitored after 24 hrs contact with insecticide and further analyzed using the Probit software to determine the mean LC₅₀ [52].

Bacterial isolation

Leaf litter microorganisms. The presence of microorganisms in the leaf litter and poplar leaf extracts was showed by plating 200 µl of extract on Luria Bertani (LB) agar plates immediately after step 2 of the synthesis process (heat shock). The plates were incubated for 24 hrs at 30°C to ensure bacterial growth. We estimated the bacterial load of leaf litter samples by counting the number of colonies (Colony-Forming Unit) per initial gram of dry leaf matter (40 ml of initial extract corresponded to 200 mg of dry leaf litter; 200 µl plated on agar corresponded to 1 mg of dry leaf litter). In order to test for their insecticidal properties, the colonies isolated on agar plates were introduced into sterile vials containing 40 ml of liquid LB broth, and grown at 25°C, without stirring. The cultures were centrifuged 72 hrs after sowing (5 000 rpm for 30 minutes), and the precipitates were re-suspended in 6 ml of distilled water to check for toxicity. The bioassays were performed according to the same protocol as previously described, with 2 ml of suspension per 50 ml of bioassay, in triplicate.

DNA extraction and PCR amplification

Different molecular methods were used in this study to further identify the bacterial strains isolated from our leaf litter samples.

Bacterial DNA was extracted with Fast DNA spin Kit (MP Biomedicals, Illkirch, France) according to the manufacturer's recommendations. Leaf litter DNA was extracted with Powersoil DNA extraction kits (Mo Bio Laboratories, USA) according to the manufacturer's recommendations. The DNA concentrations were measured using a Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technology, USA).

The genes encoding for the toxic crystal proteins of the *Bacillus thuringiensis*, namely *cyt1* and 2, *cry1*, *cry4a* and *b*, *cry8*, *cry10* and *cry11*, and 16 s RNA were sought by PCR amplification using either primers described in table 3.

Bacterial DNA was extracted using a Fast DNA spin Kit (MP Biomedicals, Illkirch, France) according to the manufacturer's recommendations. Leaf litter DNA was extracted with Powersoil DNA extraction kits (Mo Bio Laboratories, USA) according to the manufacturer's recommendations. The DNA concentrations were measured using a Nanodrop ND 1000 Spectrophotometer (Nanodrop Technology, USA).

Serotype characterization

For the flagellar serotype analysis of the *Bti* isolated from toxic or non toxic leaf litter, bacilli were incubated with rabbit antiserum specific for H14 serotype (provided by the Pasteur Institute, France)

during 15 minutes at room temperature. After 3 washes with PBS, bacilli were incubated with FITC-conjugated goat anti-rabbit Ig (Southern biotech, USA), on slides, and serotype analysis was done using fluorescent microscopy (BX41 Olympus, France). Control strains (i.e. H12 and H13 serotypes) were obtained from the Pasteur Institute's collection (Paris, France), and the H14 serotype was isolated from the commercial *Bti* formulation (Vectobac WG, Valent Biosciences Corp.). In both cases, the strains were cultivated on LB agar medium at 30°C. Prior to microscopic observation, the gram staining method was used.

AFLP genotyping

Bacillus strains used for the AFLP genotyping are listed in Table S1: 13 natural worldwide strains were obtained from the Pasteur Institute's collection, 4 commercial strains were isolated from Bactimos and Vectobac WG *Bti* commercial formulations used as spray insecticides in the Rhône-Alps region, and 6 strains were isolated from leaf litter or green leaves collected in various sites in the Rhône-Alps region.

Total genomic DNA was extracted from overnight culture at 27°C of control and isolated bacterial strains with the DNeasy tissue Kit (Qiagen) following the Gram positive bacteria protocol. DNA concentration and quality was determined by spectrometry on a NanoDrop and each sample was diluted to 30 ng/µl for the AFLP analyses [53].

Genomic DNA was first digested with *MseI* (150 ng of DNA, 1 × of Buffer NEB2, 1 µg of BSA and 2 U of *MseI* in a 17 µl reaction) and then with *EcoRI* (1 × of Buffer *EcoRI* and 5 U of *EcoRI* in a 27 µl reaction). Specific oligonucleotidic adaptors were then ligated to the end of the restriction fragments (T4 DNA ligase buffer 1 ×, 10 pmol of *EcoRI* adaptor, 50 pmol of *MseI* adaptor, and 1 U of T4 DNA ligase in a 37 µl reaction). The restriction and ligation reactions were incubated at 37°C for 2 h30.

Selective amplification was performed as previously described [54]. PCR parameters were: 10 min at 95°C followed by 36 cycles of 30 s denaturing at 94°C, 30 s annealing, and 1 min extension at 72°C, ending with 10 min at 72°C for complete extension. Annealing was initiated at a temperature of 65°C, which was reduced by 0.7°C for each of the next 12 cycles and maintained at 56°C for the subsequent 23 cycles. Two selective PCR primer pairs were selected over 8 tested for the quality of the produced bands (i.e. even distribution of bands with relatively homogeneous intensity): E+A/M+C and E+A/M+G. Products were separated by electrophoresis on an ABI 3130xl capillary sequencer. AFLP patterns were then visualised with GenMapper V3.7 software: a fluorescent peak corresponds to the presence of an amplified restriction fragment. Polymorphic peaks were checked individually and a presence/absence (i.e 1/0) matrix was constructed. Reproducibility of each primer pair was checked by carrying out two times the whole AFLP protocol for 30% of individuals randomly chosen as recommended by Bonin et al. (2004) [55].

Genetic analysis. Pairwise distances were determined by the Jaccard coefficient. To perform a cluster analysis, we used the distance matrix of the Jaccard coefficient and Unweighted Pair Group Method with Arithmetic mean (UPGMA). The reliability of each internal branch of the UPGMA dendrogram was estimated by bootstrap analysis with 1,000 replicates (Phyltools and Phylip packages). Analysis of molecular variance (AMOVA) based on euclidian pairwise distances (Φ_{ST}) was used to calculate variance component among groups, among strains within groups, and among strains using Arlequin Version 3.0 [56]. The significance of the covariance components associated with the different possible levels of genetic structure was tested using non-parametric permutation procedures (16,000 permutations).

Supporting Information

Figure S1 Agarose gel electrophoresis of the cry1, cyt1, cyt2, cry4a, cry4b, cry8, cry10, cry11-genes. PCR products obtained with the toxic bacteria isolated from decomposed leaves. M: molecular weight marker.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003432.s001 (0.17 MB DOC)

Table S1 Description of the strains used for AFLP genotyping. All natural worldwide strains were obtained from Pasteur Institute collection.

Found at: doi:10.1371/journal.pone.0003432.s002 (0.06 MB DOC)

References

- WHO (1976) 22nd report of the WHO Expert Committee on Insecticides. Geneva: World Health Organization.
- WHO (1985) Informal consultation on the development of *Bacillus sphaericus* as a microbial larvicide. Geneva: World Health Organization, TDR/BCV/sphaericus/85.3.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, et al. (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev 62: 775–806.
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, Schnepf E, Van Rie J, et al. (1998) Revision of the nomenclature of the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. Microbiol Mol Biol Rev 62: 807–813.
- Naavon A (2000) *Bacillus thuringiensis* application in agriculture. In: Charles JF, Delécluse A, Nielsen-Leroux C, eds. Entomopathogenic bacteria: from laboratory to field application. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers. pp 355–369.
- Gill SS, Singh GJ, Hornung JM (1987) Cell membrane interaction of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* cytolytic toxins. Infect Immun 55: 1300–1308.
- Thomas WE, Ellar DJ (1983) Mechanism of action of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* insecticidal delta-endotoxin. FEBS Lett 154: 362–368.
- WHO (1999) Microbial pest control agent *Bacillus thuringiensis*. Geneva: World Health Organization. pp 217. 114.
- De Respinis S, Demarta A, Patocchi N, Lüthy P, Peduzzi R, et al. (2006) Molecular identification of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to trace its fate after application as a biological insecticide in wetland ecosystems. Lett Appl Microbiol 43: 495–501.
- Martin WF, Reichelderfer CF. *Bacillus thuringiensis*: persistence and movement in field crops.; 1989 20–24 August, 1989; University of Maryland, USA, 25 p.
- DeLucca AJ II, Simonson JG, Larson AD (1981) *Bacillus thuringiensis* distribution in soils of the United States. Can J Microbiol 27: 865–870.
- Akiba Y (1991) Assessment of rainwater-mediated dispersion of field-sprayed *Bacillus thuringiensis* in soil. Jpn J Appl Entomol Z 26: 477–483.
- Boisvert M, Boisvert J (1999) Persistence of toxic activity and recycling *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in cold water: field experiments using diffusion chambers in a pond. Biocontrol Sci Technol 10: 517–561.
- Nguyen TT, Su T, Mulla MS (1999) Mosquito control and bacterial flora in water enriched with organic matter and treated with *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* formulations. J Vector Ecol 24: 138–153.
- Becker N, Margalit J (1993) Use of *Bacillus thuringiensis israelensis* against mosquitoes and blackflies. In: Entwistle PF, Cory JS, Bailey MJ, Higgs S, eds. *Bacillus thuringiensis*, an environmental biopesticide: theory and practice. New York, USA: John Wiley & Sons. pp 147–170.
- Wirth MC, Park HW, Walton WE, Federici BA (2005) Cyt1A of *Bacillus thuringiensis* delays evolution of resistance to Cry11A in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. Appl Environ Microbiol 71: 185–189.
- Georghiou GP, Wirth MC (1997) Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). Appl Environ Microbiol 63: 1095–1101.
- Nester EW, Thomashow LS, Metz M, Gordon M (2002) 100 years of *Bacillus thuringiensis*: A critical scientific assessment. Washington, DC: American Society for Microbiology. 22 p.
- Smits PH (1997) Insect pathogens: their suitability as biopesticides. In: Evans HF, ed. Microbial insecticides: novelty or necessity? Nottingham, England: Major Design & Production Ltd. pp 21–28.
- Regis L, Silva-Filha MH, Nielsen-Leroux C, Charles JF (2001) Bacterial larvicides of dipteran disease vectors. Trends Parasitol 17: 377–380.
- David JP, Rey D, Marigo G, Meyran JC (2000) Larvicidal effect of a cell-wall fraction isolated from alder decaying leaves. J Chem Ecol 26: 901–913.
- Tilquin M, Meyran JC, Asther M, Marigo G (2002) Hot extraction and characterization of a lignin fraction involved in the larvicidal effects of vegetable leaf litter against mosquito. J Chem Ecol 28: 1497–1510.
- David JP, Tilquin M, Rey D, Ravanel P, Meyran JC (2003) Mosquito larval consumption of toxic arborescent leaf-litter, and its biocontrol potential. Med Vet Entomol 17: 151–157.
- Tilquin M, Meyran JC, Marigo G (2002) Dietary toxicity of decomposed arborescent leaf litter against larval mosquito: Involvement of a lignin-polypeptidic complex. J Agric Food Chem 50: 6378–6382.
- Tilquin M, Meyran JC, Marigo G (2002) Active insecticide material, preparation method and uses thereof. In: WIPO, editor. France.
- Maldonado Blanco MG, Galan Wong IJ, Rodríguez Padilla C, Quiroz Martínez H (2002) Evaluation of polymer-based granular formulations of *Bacillus thuringiensis israelensis* against larval *Aedes aegypti* in the laboratory. J Am Mosq Control Assoc 18: 352–358.
- Ben-Dov E, Zaritsky A, Dahan E, Barak Z, Sinai R, et al. (1997) Extended screening by PCR for seven cry-group genes from field-collected strains of *Bacillus thuringiensis*. Appl Environ Microbiol 63: 4883–4890.
- Berry C, O'Neil S, Ben-Dov E, Jones AF, Murphy L, et al. (2002) Complete sequence and organization of pBtoxis, the toxin-coding plasmid of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. Appl Environ Microbiol 68: 5082–5095.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: Causes, consequences and solutions. Nat Rev Genet 6: 847–859.
- Porcar M, Caballero P (2000) Molecular and insecticidal characterization of a *Bacillus thuringiensis* strain isolated during a natural epizootic. J Appl Microbiol 89: 309–316.
- Damgaard PH, Hansen BM, Pedersen JC, Eilenberg J (1997) Natural occurrence of *Bacillus thuringiensis* on cabbage foliage and in insects associated with cabbage crops. J Appl Microbiol 82: 253–258.
- Hernandez CS, Andrew R, Bel Y, Ferre J (2005) Isolation and toxicity of *Bacillus thuringiensis* from potato-growing areas in Bolivia. J Invertebr Pathol 88: 8–16.
- Maduell P, Armengol G, Llagostera M, Orduz S, Lindow S (2008) *B. thuringiensis* is a poor colonist of leaf surfaces. Microb Ecol 55: 212–219.
- De Respinis S, Demarta A, Patocchi N, Lüthy P, Peduzzi R, et al. (2006) Molecular identification of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to trace its fate after application as a biological insecticide in wetland ecosystems. Lett Appl Microbiol 43: 495–501.
- Hajaji M, Carron A, Deleuze J, Gaven B, Setier-Rio ML, et al. (2005) Low persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar *israelensis* spores in four mosquito biotopes of a salt marsh in southern France. Microb Ecol 50: 475–487.
- Addison JA (1993) Persistence and nontarget effects of *Bacillus thuringiensis* in soil: a review. Can J For Res 23: 2329–2342.
- Hendriksen NB, Hansen BM (2002) Long-term survival and germination of *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* in a field trial. Can J Microbiol 48: 256–261.
- Hill KK, Ticknor LO, Okinaka RT, Asay M, Blair H, et al. (2004) Fluorescent amplified fragment length polymorphism analysis of *Bacillus anthracis*, *Bacillus cereus*, and *Bacillus thuringiensis* isolates. Appl Environ Microbiol 70: 1068–1080.
- Burke SA, Wright JD, Robinson MK, Bronk BV, Warren RL (2004) Detection of molecular diversity in *Bacillus atrophaeus* by amplified fragment length polymorphism analysis. Appl Environ Microbiol 70: 2786–2790.
- Whattmore AM, Murphy TJ, Shankster S, Young E, Cutler SJ, et al. (2005) Use of amplified fragment length polymorphism to identify and type *Brucella* isolates of medical and veterinary interest. J Clin Microbiol 43: 761–769.
- Keto-Timonen R, Heikinheimo A, Eerola E, Korkeala H (2006) Identification of *Clostridium* species and DNA fingerprinting of *Clostridium perfringens* by amplified fragment length polymorphism analysis. J Clin Microbiol 44: 4057–4065.
- Van der Zwet WC, Parlevliet GA, Savelkoul PH, Stoof J, Kaiser AM, et al. (2000) Outbreak of *Bacillus cereus* infections in a neonatal intensive care unit traced to balloons used in manual ventilation. J Clin Microbiol 38: 4131–4136.
- van Rossem MC, de Waal WJ, van Hanne E, Verboon-Macolek MA, van Wieringen H, et al. (2007) Enterobacter colonisation in newborn infants: predictors, follow-up and implications for infection control. J Hosp Infect 67: 142–148.

Acknowledgments

This paper is dedicated to J. C. Meyran. (1951–2004). We would like to thank the Pasteur Institute and more specifically J. F. Charles for providing the *Bti* control strains and C. Nielsen-LeRoux for providing the rabbit antiserum specific for H14 serotype. We also thank D. Rey and J.P. David (LECA) for providing toxic leaf-litter samples and information on the sites, as well as J. Patouraux for technical assistance for bioassays.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: MT SR LD RAG JG. Performed the experiments: MT MP SR JG. Analyzed the data: MT MP SR LD JG. Contributed reagents/materials/analysis tools: PR RAG. Wrote the paper: MT MP SR LD RAG JG. Provided laboratory space for the work, and financial support: PR.

44. Janssen P, Coopman R, Huys G, Swings J, Bleeker M, et al. (1996) Evaluation of the DNA fingerprinting method AFLP as a new tool in bacterial taxonomy. *Microbiology* 142: 1881–1893.
45. Ryu C, Lee K, Hawng HJ, Yoo CK, Seong WK, et al. (2005) Molecular characterization of Korean *Bacillus anthracis* isolates by amplified fragment length polymorphism analysis and multilocus variable-number tandem repeat analysis. *Appl Environ Microbiol* 71: 4664–4671.
46. Kokotovic B, Angen O (2007) Genetic diversity of *Actinobacillus pleuropneumoniae* assessed by amplified fragment length polymorphism analysis. *J Clin Microbiol* 45: 3921–3929.
47. Pattanayak D, Srinivasan K, Mandaokar AD, Shukla A, Bhalla R, et al. (2000) AFLP fingerprinting and genotypic characterization of some serovars of *Bacillus thuringiensis*. *World J Microb Biot* 16: 667–672.
48. David JP, Hubert A, Failloux AB, Rey D, Meyran JC (2003) The role of environment in shaping the genetic diversity of the subalpine mosquito, *Aedes rusticus* (Diptera, Culicidae). *Mo Ecol* 12: 1951–1961.
49. Boyer S, Tilquin M, Ravanel P (2007) Differential sensitivity to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and temephos in field mosquito populations of *Ochlerotatus cataphylla* (Diptera: Culicidae): toward resistance? *Environ Toxicol Chem* 26: 157–162.
50. David JP, Rey D, Pautou MP, Meyran JC (2000) Differential toxicity of leaf litter to dipteran larvae of mosquito developmental sites. *J Invertebr Pathol* 75: 9–18.
51. Pearson D, Ward OP (1987) Purification of the parasporal crystals of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* and development of a novel bioassay technique. *Biotechnol Lett* 9: 771–776.
52. Raymond M (1993) PROBIT CNRS-UMII. Licence L93019. St-Georges-d'Orques, France: Avenix.
53. Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Vandelee T, et al. (1995) Aflp - A New Technique For Dna-Fingerprinting. *Nucleic Acids Res* 23: 4407–4414.
54. Bonin A, Pompanon F, Taberlet P (2005) Use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers in surveys of vertebrate diversity. *Methods Enzymol* 395: 145–61.
55. Bonin A, Bellemain E, Eidesen PB, Pompanon F, Brochmann C, et al. (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Mol Ecol* 13: 3261–3273.
56. Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics* 1: 47–50.
57. Polz MF, Cavanaugh CM (1998) Bias in template-to-product ratios in multitemplate PCR. *Appl Environ Microbiol* 64: 3724–3730.
58. Bravo A, Sarabia S, Lopez L, Ontiveros H, Abarca C, et al. (1998) Characterization of cry genes in a Mexican *Bacillus thuringiensis* strain collection. *Appl Environ Microbiol* 64: 4965–4972.
59. Ibarra JE, del Rincon MC, Orduz S, Noriega D, Benintende G, et al. (2003) Diversity of *Bacillus thuringiensis* strains from Latin America with insecticidal activity against different mosquito species. *Appl Environ Microbiol* 69: 5269–5274.

Chapitre 2- Apparition et évolution de la résistance au *Bti* proliférant dans les litières végétales : sélection artificielle d'une souche d'*Aedes aegypti* au laboratoire

I- Présentation de l'étude et principaux résultats

Les bactéries *Bacillus thuringiensis israelensis* peuvent proliférer et s'accumuler dans l'environnement, induisant une exposition des larves aux toxines de *Bti* au cours de leur développement larvaire. Afin de déterminer l'impact du *Bti* rémanent dans l'environnement sur l'évolution de la résistance chez les moustiques, une souche sensible d'*Aedes aegypti* a été sélectionnée au laboratoire avec de la litière végétale prélevée en milieu naturel et contenant des toxines de *Bti* (voir chapitre I). Cette souche sélectionnée sera nommée souche LiTOX dans le présent manuscrit.

A chaque génération, les larves ont été exposées à des doses de litière toxique permettant d'atteindre 70 % de mortalité en moyenne et d'obtenir environ 1000 adultes reproducteurs pour la génération suivante. Afin de limiter les effets de la dérive génétique, une introgression moyenne de 2.5 % d'individus sensibles a été effectuée à chaque génération. L'évolution de la résistance à la litière toxique a été mesurée pour 6 des 18 générations à l'aide de bioessais standardisés. Grâce à des bactéries recombinantes de *Bti*, les quatre principales toxines du *Bti* ont pu être produites de façon individuelle ou en mélange. Le degré de résistance de la souche LiTOX à ces toxines, au *Bti* ainsi qu'aux litières toxiques a été estimé après la 18^{ème} génération de sélection.

Après 18 générations de sélection, la souche LiTOX présente des taux de résistance faibles au *Bti* et à la litière toxique. Cependant, **une résistance significative a été mesurée pour les toxines Cry du *Bti*** : la souche LiTOX est 30, 14 et 6 fois plus résistante aux toxines Cry4A, Cry4B et Cry11 respectivement (article 2 : Paris et al., en préparation). Enfin, une résistance de 3 fois de la souche LiTOX vis à vis la toxine cytolitique Cyt1A a été mesurée. Ce travail montre que la résistance aux toxines individuelles du *Bti* est masquée lorsque le *Bti* ou les litières toxiques comprenant les toxines en mélanges sont testés. Ce résultat a des

implications vis-à-vis du suivi de l'évolution de la résistance au *Bti* en populations naturelles ; car tester la résistance au *Bti* uniquement ne permet pas de détecter les niveaux de résistance aux toxines individuelles. Or, à terme, une accumulation séquentielle de la résistance à chacune des toxines du *Bti* dans les populations naturelles pourrait permettre l'apparition imprévue d'une résistance au *Bti* commercial.

Les résultats obtenus lors de cette étude montrent aussi que certains individus de la souche LiTOX (environ 25% à la génération 18) présentent une durée de développement larvaire allongée de 4 jours. Ces individus montrent une résistance aux toxines Cry4B (23 fois) et Cry11 (7 fois), tandis que leur niveau de résistance à la toxine Cry4A est quasi nulle. Ce résultat suggère qu'il n'existe pas de résistance croisée entre la toxine Cry4A et les toxines Cry4B et Cry11, et qu'au moins **deux mécanismes de résistance distincts** ont été sélectionnés dans la souche LiTOX.

II- Contribution sous forme d'article

Article 2 : PARIS M, TETREAU G, LAURENT F, LELU M, DESPRES L, DAVID JP. *Bti* persistence in environment induces resistance to multiple *Bti* toxins. Pest Managment Science, sous press.

Chapitre 2 - Article 2

***Bti* persistence in environment induces resistance to multiple *Bti* toxins.**

PARIS M, TETREAU G, LAURENT F, LELU M, DESPRES L, DAVID JP

Pest Management Science, sous presse.

Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS-UMR 5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

Key words : *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, insect resistance, *Aedes aegypti*, Cry and Cyt toxins

Corresponding author: Margot Paris. Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS-UMR 5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

Tel: +33 4 76 63 56 99. Fax: +33 4 76 51 42 79.

Email: margotparis1@gmail.com

Running title: mosquito resistance to *Bti* toxins

1 INTRODUCTION

Mosquito control represents a major public health concern, as mosquitoes transmit many severe human diseases such as malaria, filariasis, dengue fever, yellow fever, West Nile virus and chikungunya virus (Hemingway & Ranson 2000). Since the fifties, the massive use of chemical insecticides has led to undesired toxicity on non-target organisms (Green *et al.* 1990, Lacet & Siegel 2000) and the selection of insecticide resistance mechanisms in mosquito populations (Hemingway *et al.* 2004, Nauen 2007). A safe alternative to chemical insecticides is the spraying of toxins produced by the bacteria *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) in mosquito breeding sites (Regis *et al.* 2001, Lacey 2007).

Bti bacteria produce a solid parasporal crystal composed of a mixture of four major insecticidal proteins: Cry4A, Cry4B, Cry11A and Cyt1A (Schnepf *et al.* 1998, Crickmore *et al.* 1998). When ingested by mosquito larvae, gut proteases solubilize and convert the inactive crystal into active toxins which interact with midgut cell membranes leading to the formation of pores, cell lysis, septicemia and then larvae death (Gill *et al.* 1992, de Maagd *et al.* 2001). One particularity of *Bti* toxins is that they interact synergistically leading to high toxicity when used in combination (Poncet *et al.* 1995, Perez *et al.* 2005, Wirth *et al.* 1997). Another advantage of *Bacillus thuringiensis* toxins over chemical insecticides is their high specificity towards insect membrane receptors and their safety for non-target insects, vertebrates or mammals (Thomas & Ellar 1983, Green *et al.* 1990, Charbonneau *et al.* 1994, Lacey *et al.* 2000). Consequently, *Bti* has been used in the French Rhône-Alpes region since 1990 for the control of mosquitoes. In 2007, bacterio-insecticides became the only insecticides authorized for mosquito larvae control in metropolitan France and several other European countries.

While *Bacillus thuringiensis* bacteria are usually described as poor colonists and non remnant in the environment (de Respinis *et al.* 2006, Maduell *et al.* 2008), high concentrations of viable *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* spores were found in decaying leaf litter collected in the bottom of a mosquito breeding site from the French Rhône-Alpes region several months after *Bti* treatments (David *et al.* 2002, Tilquin *et al.* 2008). In this study site, the persistence and proliferation of *Bti* bacteria progressively led to an acute toxicity of the leaf litter against mosquito larvae. As organic detritus represent a major larval food source for mosquitoes (Clements 1992), a direct consequence of *Bti* persistence is a prolonged exposure of mosquitoes to *Bti* toxins throughout their aquatic development. Such situation may favor the appearance and

1 spread of resistance in mosquito populations, compromising the long-term efficiency of this bio-
2 insecticide.

3 In natural mosquito populations, no consistent resistance has been detected even after
4 long periods of repeated treatments with *Bti* toxins (Goldman *et al.* 1986, Becker & Ludwig
5 1993), but recent studies suggested that moderate *Bti* toxin resistance may occur locally (Paul *et*
6 *al.* 2005, Boyer *et al.* 2007, Paris *et al.* in press). In laboratory conditions, only moderate
7 resistance levels have been selected in the mosquitoes *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*
8 after several generations of intense selection using the complete *Bti* toxins mixture (Goldman *et*
9 *al.* 1986, Georgiou & Wirth 1997, Saleh *et al.* 2003). However, laboratory selection with each
10 *Bti* toxin separately allowed to reach high resistance levels to individual toxins after few
11 generations (Georgiou & Wirth 1997).

12 Although resistance mechanisms to *Bti* toxins are still unknown in dipterans, resistances
13 to other Cry toxins have been intensively studied in lepidopterans resistant to transgenic crops
14 producing *Bacillus thuringiensis* Cry toxins (Ferre & Van Re 2002, Griffit & Aroian 2005).
15 Nowadays, the decrease in the activity of midgut proteases involved in toxins activation and
16 modifications in specific membrane receptors are the two main mechanisms described for
17 resistance to Cry toxins (Oppert *et al.* 1997, Morin *et al.* 2003, Bravo *et al.* 2007). Cross-
18 resistance mechanisms between different Cry toxins have been reported, presumably involving
19 shared membrane receptors (Griffitts *et al.* 2001, Zhao *et al.* 2001, Siquiera *et al.* 2004).

20 In this context, the goal of this study was to evaluate the effect of repeated contact of
21 mosquito larvae with leaf litter containing *Bti* toxins on the evolution of resistance. *Aedes*
22 *aegypti* larvae were selected with field-collected leaf litter containing *Bti* toxins in laboratory
23 conditions and resistance level was monitored along several generations. After 18 generations,
24 resistance levels of selected and susceptible strains to i) leaf litter containing *Bti* toxins, ii)
25 commercial full *Bti* toxins mixture, and iii) each of the four principal *Bti* toxins, were compared
26 in order to evaluate the impact of *Bti* persistence in the environment on the emergence of
27 resistance mechanisms. These results are then discussed in the perspective of a massive and long
28 term usage of *Bti* for mosquito control.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 Toxic leaf litter containing *Bti* toxins

Leaf litter mainly composed of *Alnus glutinosa*, *Populus nigra* and *Quercus robur* decayed leaves and containing large amount of viable *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* spores from previous mosquito control treatments was collected in August 1998 in the French Rhône-Alpes region (Tilquin *et al.* 2008). This decayed leaf litter showed an acute toxicity against mosquito larvae (David *et al.* 2002). After collection, leaf litter was air dried at 30°C for 24h, powdered on a 0.5 mm mesh, carefully homogenized, and stored at -80°C in sterile vials until use for mosquito larva selection and bioassays.

2.2 Mosquito strain selection

The *Aedes aegypti* laboratory strain Bora-Bora susceptible to all insecticides was used for selection with toxic leaf-litter (LiTOX strain). Mosquitoes were reared in standard insectary conditions (27°C, 8h/12h light/dark period, 80% relative humidity). Larvae were reared in tap water and fed with standard larval food (hay pellet) until selection with toxic leaf litter. At each generation, 6000 early 4th instar larvae of the LiTOX strain were split into groups of 200 larvae and exposed to toxic leaf litter in 200 mL of tap water. At each generation, the amount of leaf litter used for selection (from 10 mg/L to 500 mg/L) was adapted to the LiTOX strain susceptibility in order to reach 70 % larval mortality after 48h exposure. After selection, surviving larvae were transferred to tap water, fed with standard larval food and allowed to emerge as adults, reproduce, blood feed on mice and lay eggs for the next generation. An average introgression rate of 2.5 % of susceptible Bora-Bora mosquitoes (adult males and females) at each generation was performed in order to limit bottleneck and genetic drift effects in the selected strain. The average generation turnover was 45 days and selection was carried out repeatedly for 18 generations.

2.3 *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* toxins production and purification

Recombinant *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* strains transformed with the plasmids pHT606, pHT618, pHT652, pWF53, and pWF45 producing respectively the toxins Cry4A, Cry4B, Cry4A+Cry4B, Cry11 and Cyt1A were obtained from the Pasteur Institute, Paris, France (Delécluse *et al.* 1993, Poncet *et al.* 1993) or from Prof. B. Federici (Wu & Federici 1993, Wu *et al.* 1994). Toxin suspensions were prepared in 100 mL sporulation medium under 200 rpm

1 agitation at 30°C for 72 h (Lecadet *et al.* 1980). Spores and crystal inclusions were then
2 harvested, washed with a solution of NaCl 1M and EDTA 10mM, washed again with distilled
3 water and stored at -20°C until use.

4 To check for the presence of recombinant plasmids and the absence of contaminants, all
5 recombinant *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* strain, sporulation medium culture and final
6 toxin suspensions were tested by PCR amplification of genes encoding the toxins Cry4A, Cry4B,
7 Cry11 and Cyt1A. PCR reactions were performed using 0.2 µM of the primers described in
8 Tilquin *et al.* (2008), with the following conditions: 95°C for 10 min, 31 cycles of 95°C for 30 s,
9 50°C for 15 s, 72°C for 45 s. Total genomic DNA was extracted from overnight culture of each
10 recombinant strains using the DNeasy tissue Kit (Qiagen) following the Gram positive bacteria
11 protocol.

13 **2.4 Bioassays**

14 *2.4.1 Evolution of resistance to toxic leaf litter*

15 To monitor the evolution of resistance to toxic leaf litter along the selection process,
16 larval tolerance was monitored from the 10th generation at six different generations for the
17 LiTOX strain (generation 10, 12, 13, 15, 16 and 18) and at four generations for the susceptible
18 Bora-Bora strain (generation 10, 12, 16 and 18). Larval tolerance was tested at the diagnostic
19 dose of 30 mg/L toxic leaf litter using standard bioassay procedure described by the World
20 Health Organization (WHO, 2005). Bioassays were performed in plastic cups containing 20
21 calibrated 4th-instar larvae in 50 mL of toxic leaf litter suspension or tap water for negative
22 controls. All bioassays were performed at least in triplicates. The ‘strain effect’ (LiTOX or
23 susceptible) and the ‘generation number effect’ (quantitative factor) on larval mortality were
24 tested using a general linear model (GLM) with quasi-binomial error using R software version
25 2.5 (R Development Core Team 2005).

27 *2.4.2 Differential resistance of the LiTOX strain to toxic leaf litter, commercial Bti toxin mixture 28 and separate Bti toxins*

29 Relative resistance level of the LiTOX strain to commercial *Bti* mixture (Vectobac WG®,
30 3500 ITU/mg, International Toxic Units, Abbott Laboratories), toxic leaf litter and each separate
31 *Bti* toxin Cry4A, Cry4B, Cry4A+Cry4B, Cry11 and Cyt1A were determined comparatively to
32 the susceptible strain after 18 generations of selection from standard bioassays (see above). A
33 minimum of five concentrations producing a mortality rate from 0 % to 100 % after 24h

exposure were used. The lethal dose for 50 % of individuals after 24h exposure (24h-LD₅₀) was calculated using the Log-Probit module of XLSTAT software (Addinsoft). Resistance ratio (RR) of the LiTOX strain to each toxic mixture was calculated by dividing the 24h-LD₅₀ value obtained for the LiTOX strain with the 24h-LD₅₀ value obtained for the Bora-Bora strain. Confidence intervals (CI) limits of RR at 95% confidence were calculated by dividing the extreme CI 95% values of 24h-LD₅₀ obtained for the LiTOX strain by those obtained for the Bora-Bora strain.

2.4.3 Interaction between leaf litter and Bti toxins

In order to determine the possible interaction between leaf litter components and *Bti* toxins on larval mortality, resistance levels of the LiTOX and Bora-Bora strains to *Bti* toxins were compared across four different dietary conditions: 1) toxic leaf litter, 2) commercial *Bti* mixture, 3) commercial *Bti* mixture mixed with non-toxic leaf litter and 4) commercial *Bti* mixture mixed with standard larval food (hay pellets). Non-toxic leaf litter was collected in a nearby non-treated breeding site of the Rhône-Alpes region and is composed of similar leaf particles as toxic leaf litter (identical tree leaves composition and decaying stage). In order to match conditions experimented by larvae during artificial selection and bioassays with toxic leaf litter, a concentration of 50 mg/L of additional diet (non-toxic leaf litter or standard larval food) was added to commercial *Bti* mixture. Bioassays with each diet type were performed simultaneously with at least four doses of commercial *Bti* mixture producing a larval mortality ranging from 2.5 % to 100 % after 24h exposure. Bioassays were replicated four times.

2.4.4 Phenotype modification associated with resistance to Bti toxins

Throughout the selection process of the LiTOX strain, we identified a subset (approximately 25 %) of LiTOX individuals exhibiting an increase of about 5 days in larval development time in comparison with other LiTOX individuals and the susceptible Bora-Bora strain. Slow development LiTOX larvae were named LiTOX_S. When performing previous bioassays, only normal LiTOX individuals were used and compared with the susceptible Bora-Bora strain. In order to evaluate the relation between this phenotypic trait (slow larval development) and resistance to *Bti* toxins, larvae of the LiTOX_S and normal LiTOX phenotypes were bioassayed comparatively to Bora-Bora larvae with the three Cry toxins for which the LiTOX strain showed significant resistance levels (Cry4A, Cry4B and Cry11A). Comparative bioassays were performed as described above on 4th-stage larvae of similar body

size (5 days older for LiTOX_S). For each LiTOX phenotype, resistance ratios (RR) and confidence intervals (CI) at 95% were calculated as described above.

3 RESULTS

3.1 Evolution of resistance to leaf litter containing *Bti* toxins

Larvae selected across successive generations with toxic leaf litter (LiTOX strain) acquired a significant level of resistance to this *Bti* toxins-containing material in only few generations (Figure 1). The larval mortality of the selected strain LiTOX at the diagnostic dose of 30 mg/L toxic leaf litter decreased from nearly 100 % to 11.7 % after only 18 generations of selection. Statistical analysis using a general linear model (GLM) revealed significant effects of the strain ($\chi^2 = 127.026$, Df = 1, $P < 0.001$) and of the generation number ($\chi^2 = 63.382$, Df = 5, $P < 0.001$) on larval mortality confirming the progressive increase of resistance in the LiTOX strain. Even after 18 generations of selection, the increase in larval tolerance of the LiTOX strain to toxic leaf litter had not reached a plateau, suggesting that the selection of resistant allele(s) is not complete and that higher resistance level can be obtained with further generations of selection. After 18 generations of selection, the resistance ratio (RR₅₀) of the LiTOX strain to toxic leaf litter is 3.4-fold higher than the resistance level of the susceptible strain Bora-Bora (Table 1).

3.2 Resistance to commercial *Bti* toxin mixture and to separate *Bti* toxins

After 18 generations of selection, the LiTOX strain exhibited a small but significant increased resistance to commercial *Bti* toxins mixture (Table 1) with RR₅₀ of 2.0-fold. This resistance level was significantly lower than resistance level measured with toxic leaf litter. The LiTOX strain was significantly resistant to all Cry toxins tested individually with RR₅₀ of 30.2-fold, 13.7-fold and 6.3-fold for Cry4A, Cry4B and Cry11 respectively. When Cry4A and Cry4B were tested in mixture, the resistance ratio of the LiTOX strain fell to 6.0-fold and was significantly lower than the resistance ratio observed for Cry4A, but not significantly lower than that observed for Cry4B. Finally, a moderate but significant RR₅₀ of 3-fold to Cyt1A was observed between the LiTOX strain and the susceptible Bora-Bora strain.

3.3 Impact of dietary particles on *Bti* resistance

The addition of either larval food or non-toxic leaf litter particles to *Bti* toxins for bioassays significantly reduced larval mortality in both strains (Table 2). However, none of the dietary particles had a significant effect on resistance ratios observed between the LiTOX strain and the susceptible strain Bora-Bora, indicating an absence of specific effect of leaf litter on larval tolerance to *Bti* toxins. Finally, the resistance level of the LiTOX strain to toxic leaf litter was slightly but significantly higher than for *Bti* toxins alone and for *Bti* toxins with additional diet particles, indicating that the relative amount of each *Bti* toxins between commercial *Bti* mixture and toxic leaf litter might differ.

3.4 Impact of the leaf-litter selection on larval development time and resistance to *Bti* toxins

Resistance levels from LiTOX_S larvae to Cry toxins were compared with resistance levels obtained from normal LiTOX larvae showing the same development time as Bora-Bora larvae (Figure 2). Considering 95% confidence intervals of resistance ratios, no significant difference in resistance to Cry4B and Cry11A were found between the two LiTOX phenotypes. In contrast, LiTOX_S larvae were significantly less resistant to Cry4A than normal LiTOX larvae (1.6-fold versus 30.2-fold comparatively to Bora-Bora strain), suggesting that the two LiTOX phenotypes have different genotypes regarding Cry4A resistance.

4 DISCUSSION

4.1 Selection of resistance to *Bti* toxins

Along our controlled selection process, resistance of *Aedes aegypti* to *Bti* Cry toxins evolved after only few generations of larval selection with toxic leaf litter containing *Bti* toxins. The resistant LiTOX strain developed 30.2-fold, 13.7-fold and 6.3-fold resistances to Cry4A, Cry4B and Cry11 respectively.

The LiTOX strain developed resistance to distant Cry toxins: Cry4 and Cry11 toxins share less than 45% identity in amino-acid sequences (need ref here). In addition, it developed a low but significant resistance to Cyt1A toxin. To date, only low resistance to Cyt1A has been reported even after several generations of selection with *Bti* and Cyt toxins are often considered as the key proteins hindering the rapid development of resistance to full *Bti* mixture (Wirth *et al.* 1997, Georghiou & Wirth 1997, Wirth *et al.* 2003). Cyt toxins are able to directly insert in the midgut epithelium without binding to specific membrane receptors (Promdonkoy & Ellar 2003,

Butko *et al.* 2003, Manceva *et al.* 2005). Furthermore, the Cyt1A loop $\beta 6$ - αE domain was described as a membrane bound receptor to Cry11A, promoting the formation of a pre-pore oligomeric structure with Cry11A (Perez *et al.* 2005, Perez *et al.* 2007). As a result, the binding of these two toxins together may i) enhance toxicity of Cry11A by providing many more membrane receptors and ii) reduce resistance linked to modification in the sequence or abundance of specific Cry11A receptors. Similar binding interactions are suspected between Cyt1A and Cry4 toxins for which synergetic interactions have been observed (Perez *et al.* 2005). Considering these synergistic interactions, it is not surprising to observe higher resistance levels of the LiTOX strain to separate Cry toxins compared to commercial *Bti* mixture and toxic leaf litter, both likely containing Cyt toxins.

4.2 Interactions between Cry4A and Cry4B

The LiTOX strain exhibited a higher resistance level to Cry4A (30.2 fold) than to Cry4B (13.7 fold) while its resistance level to Cry4A+Cry4B mixture decreased to 6-fold, suggesting a synergism between Cry4A and Cry4B toxins. Synergic interactions between these two toxins have already been observed in *Ae. aegypti*, *Culex pipiens* and *Anopheles stephensi* (Poncet *et al.* 1995). Here we confirmed that the mixture of the two Cry4 toxins lowers the expression of resistance of the LiTOX strain comparatively to individual Cry4 toxins.

About a quarter of the selected individuals of the LiTOX strain showed slow larval development (LiTOX_S) and exhibited resistance to Cry4B, but were not resistant to Cry4A. Several cross-resistance phenotypes to Cry toxins have been observed in insects (Wirth *et al.* 1998, Griffitts *et al.* 2001, Zhao *et al.* 2001). A single autosomal recessive gene in the Lepidoptera *Plutella xylostella* confers resistance to three related Cry1A toxins (Cry1Aa, Cry1Ab, Cry1Ac, Tabashnik *et al.* 1997). Cross-resistance between even more distant Cry toxins has been described for the nematode *Caenorhabditis elegans* (Cry4B and Cry14A, Griffitts *et al.* 2001) and the Lepidoptera *Heliothis virescens* (Cry1A and Cry2A, Gould *et al.* 1992). No cross-resistance between Cry4A and Cry4B was observed for LiTOX_S individuals, suggesting that two distinct resistance mechanisms are involved in the resistance of these individuals to these two toxins. Cross-resistance patterns between Cry toxins are complex and might be linked to the resistance mechanism implicated. It has been suggested that a single modification in protease activities could confer cross-resistance to several Cry toxins (Gould *et al.* 1992, Rukmini *et al.* 2000). Conversely, resistance linked to binding sites modifications appears to be more specific, and cross-resistance is therefore limited to closely related toxins (Tabashnik *et al.* 1997, Griffitts &

1 Aorian 2005, Pigott *et al.* 2007, Abdullah *et al.* 2006). In this context, the absence of cross-
2 resistance between Cry4A and Cry4B observed in LiTOX_S individuals may indicate that
3 resistance to these two toxins is rather linked to specific receptor binding than to protease
4 activities.

5 In contrast, slow developing LiTOX_S larvae were as resistant to Cry11A as normal
6 larvae, suggesting that no or limited cross-resistance occurs between Cry11A and Cry4A (Figure
7 2). Cross-resistance between Cry4 and Cry11 toxins have been described on the mosquito *Culex*
8 *quinquefasciatus* (Wirth *et al.* 1998). Further experimental work is required to confirm these
9 results and determine if cross-resistance between Cry4B and Cry11A occurs in the LiTOX strain.

11 **4.3 Monitoring *Bti* toxins resistance in natural populations**

12 Resistances to Cry toxins are known to appear rapidly in lepidopteran or dipteran species
13 when *Bt* treatments that do not contain Cyt toxins are applied (Ferre & Van Re 2002, Griffit &
14 Aroian 2005). Here, we show that multiple resistances to Cry toxins in the mosquito *Ae. aegypti*
15 can arise rapidly, even in presence of Cyt toxins. In most studies investigating the emergence of
16 resistance to *Bti* treatment in laboratory or under field conditions, only resistance to complete *Bti*
17 toxins mixture is investigated (Goldman *et al.* 1986, Georghiou & Wirth 1997, Paul *et al.* 2005,
18 Boyer *et al.* 2007). The resistance ratio to commercial *Bti* observed in these studies is usually of
19 the same order of magnitude as the RR_{50} we observed for the LiTOX strain (2-3-fold resistance,
20 Goldman *et al.* 1986, Becker & Ludwig 1993, Zhang *et al.* 2004), suggesting that much higher
21 resistance to individual toxins could have actually evolved in the tested populations. Considering
22 that resistance to Cry toxins might act as a first step to resistance to full *Bti* toxins mixture, our
23 results highlight the importance to test each toxin individually for an accurate monitoring of *Bti*
24 toxin resistance evolution in field populations.

26 **4.4 Influence of leaf litter in *Bti* resistance**

27 In our study, the addition of larval food or leaf litter particles to *Bti* toxins for bioassays
28 leads to an increase of LC_{50} , indicating a higher survival rate of larvae in presence of dietary
29 particles. Similarly, a decrease in *Bt* efficacy was found in the species *Choristoneura fumiferana*
30 when larvae were submitted to a high quality diet rather than to a poor quality diet (Bauce *et al.*
31 2002). Indeed, larvae can compensate the lower quality diet by increasing their food
32 consumption and *Bt* toxin absorption (Bauce *et al.* 2002).

Furthermore, no variation in resistance level was observed when larval food or non-toxic leaf litter were mixed with commercial *Bti* toxins mixture. Many cases of insect-pathogens interactions influenced by plant compounds have been described (Cory & Hoover 2006). For example, previous studies suggested that plant secondary compounds can affect the expression of resistance to *Btk* toxins in phytophagous insects (Ludlum *et al.* 1991, Navon *et al.* 1993, Janmaat & Myers 2007). Our results suggest that there is no interaction between the toxicity of *Bti* toxins and leaf litter particles.

4.5 Environmental consequences of *Bti* persistence

The *Aedes aegypti* LiTOX strain developed significant resistance to both Cry and Cyt toxins using field-collected leaf litter containing *Bti* toxins as selective agent, suggesting that both Cyt and Cry toxins are persistent in toxic leaf litter. However, the resistance level of the LiTOX strain to leaf litter was significantly higher than to commercial *Bti* mixture, suggesting that the relative amount of each *Bti* toxins between commercial *Bti* mixture and toxic leaf litter may differ. This is not surprising as the degradation of the different *Bti* toxins is likely to vary through time. Indeed, toxic leaf litter was collected several months after *Bti* treatment (David *et al.* 2002), a sufficient time for toxins to exhibit differential persistence and degradation. A modification in toxin proportions could lead to a decrease of their synergistic interactions. Furthermore, as the synergism between Cyt and Cry toxins is likely to circumvent resistance to Cry toxins (Georghiou & Wirth 1997, Wirth *et al.* 2003), a decrease of Cyt toxins in the environment may lead to the rapid emergence of resistance to Cry toxins. Although the emergence of multiple resistance mechanisms (i.e. several independent resistance mechanisms to different toxins) is considered likely to be delayed because all toxins are spread together (Wirth *et al.* 1997, 2003, Zhao *et al.* 2003), the differential persistence of particular *Bti* toxins may favor the sequential selection of resistance to *Bti* toxins.

In this context it appears of primary importance to determine i) the rate of occurrence of *Bti* persistence and proliferation in mosquito breeding sites, ii) the particular biotic and abiotic conditions that allowed these events and iii) if such events are specific to the arborescent Rhône-Alpine sites or can potentially occur in other types of mosquito breeding sites. Monitoring spatial and temporal variations of the quantity of *Bti* bacteria and its toxins in the environment together with resistance levels of mosquito populations will provide precious data to explain how resistance to this bacterial insecticide may emerge and evolve in natural conditions.

AKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Brian Federici for providing the *Bti* recombinant strain used in this work, and Joëlle Patoureau, Sébastien Boyer, Sophia Weeb, Marie Pireyre and Martin Paris for technical assistance. This study was supported by a grant from the French Rhône-Alpes region (grants #0501545401) and by the French National Research Agency (ANR, project DIBBECO).

REFERENCES

- Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochem* **7**, 16.
- Back C, Boisvert J, Lacoursiere JO, Charpentier G (1985) High-Dosage Treatment Of A Quebec Stream With *Bacillus-Thuringiensis* Serovar - *Israelensis* - Efficacy Against Black Fly Larvae (Diptera, Simuliidae) And Impact On Nontarget Insects. *Canadian Entomologist* **117**, 1523-1534.
- Bauce E, Bidon T, Berthiaume R (2002) Effects of food nutritive quality and *Bacillus thuringiensis* onfeeding behaviour, food utilization and larval growth of spruce budworm *Choristoneura fumiferana* (Clem.) when exposed as fourth- and sixth-instar larvae. *Agricultural and Forest Entomology* **4**, 57-70.
- Becker N, Ludwig M (1993) Investigations On Possible Resistance In *Aedes-Vexans* Field Populations After A 10-Year Application Of *Bacillus-Thuringiensis-Israelensis*. *Journal Of The American Mosquito Control Association* **9**, 221-224.
- Boyer S, Tilquin M, Ravanel P (2007) Differential sensitivity to *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* and temephos in field mosquito populations of *Ochlerotatus cataphylla* (Diptera: Culicidae): Toward resistance? *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**, 157-162.
- Bravo A, Gill SS, Soberon M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**, 423-435.
- Butko P (2003) Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: Data and hypotheses. *Applied And Environmental Microbiology* **69**, 2415-2422.
- Charbonneau CS, Drobney RD, Rabeni CF (1994) Effects Of *Bacillus-Thuringiensis* Var *Israelensis* On Nontarget Benthic Organisms In A Lentic Habitat And Factors Affecting The Efficacy Of The Larvicide. *Environmental Toxicology And Chemistry* **13**, 267-279.
- Clements AN (1992) *Biology of Mosquitoes, Vol. I: Development, Nutrition, Reproduction*. Chapman & Hall, London/Glasgow/New York/Tokyo/Melbourne/Madras, UK.
- Cory JS, Hoover K (2006) Plant-mediated effects in insect-pathogen interactions. *Trends In Ecology & Evolution* **21**, 278-286.
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, *et al.* (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* **62**, 807.
- David JP, Rey D, Cuany A, Bride JM, Meyran JC (2002) Larvicidal properties of decomposed leaf litter in the subalpine mosquito breeding sites. *Environmental Toxicology And Chemistry* **21**, 62-66.
- de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends In Genetics* **17**, 193-199.
- De Respinis S, Demarta A, Patocchi N, *et al.* (2006) Molecular identification of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to trace its fate after application as a biological insecticide in wetland ecosystems. *Letters In Applied Microbiology* **43**, 495-501.
- Delecluse A, Poncet S, Klier A, Rapoport G (1993) Expression Of Cryiva And Cryivb Genes, Independently Or In Combination, In A Crystal-Negative Strain Of *Bacillus-Thuringiensis* Subsp *Israelensis*. *Applied And Environmental Microbiology* **59**, 3922-3927.
- Ferre J, Van Rie J (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review Of Entomology* **47**, 501-533.
- Georghiou GP, Wirth MC (1997) Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera:

- Culicidae). *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1095-1101.
- Gill SS, Cowles EA, Pietrantonio PV (1992) The Mode Of Action Of Bacillus-Thuringiensis Endotoxins. *Annual Review Of Entomology* **37**, 615-636.
- Goldman IF, Arnold J, Carlton BC (1986) Selection For Resistance To Bacillus-Thuringiensis Subspecies Israelensis In Field And Laboratory Populations Of The Mosquito Aedes-Aegypti. *Journal Of Invertebrate Pathology* **47**, 317-324.
- Gould F, Martinezramirez A, Anderson A, *et al.* (1992) Broad-Spectrum Resistance To Bacillus-Thuringiensis Toxins In Heliothis-Virescens. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **89**, 7986-7990.
- Green M, Heumann M, Sokolow R, *et al.* (1990) Public-Health Implications Of The Microbial Pesticide Bacillus-Thuringiensis - An Epidemiologic-Study, Oregon, 1985-86. *American Journal Of Public Health* **80**, 848-852.
- Griffitts JS, Aroian RV (2005) Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *Bioessays* **27**, 614-624.
- Griffitts JS, Whitacre JL, Stevens DE, Aroian RV (2001) Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science* **293**, 860-864.
- Haider MZ, Ellar DJ (1987) Analysis Of The Molecular-Basis Of Insecticidal Specificity Of Bacillus-Thuringiensis Crystal Delta-Endotoxin. *Biochemical Journal* **248**, 197-201.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry And Molecular Biology* **34**, 653-665.
- Hemingway J, Ranson H (2000) Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review Of Entomology* **45**, 371-391.
- Hofmann C, Vanderbruggen H, Hofte H, *et al.* (1988) Specificity Of Bacillus-Thuringiensis Sigma-Endotoxins Is Correlated With The Presence Of High-Affinity Binding-Sites In The Brush-Border Membrane Of Target Insect Midguts. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **85**, 7844-7848.
- Huffman DL, Abrami L, Sasik R, *et al.* (2004) Mitogen-activated protein kinase pathways defends against bacterial pore-forming toxins. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **101**, 10995-11000.
- Janmaat AF, Myers JH (2007) Host-plant effects the expression of resistance to Bacillus thuringiensis kurstaki in Trichoplusia ni (Hubner): an important factor in resistance evolution. *Journal Of Evolutionary Biology* **20**, 62-69.
- Jurat-Fuentes JL, Adang MJ (2004) Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant Heliothis virescens larvae. *European Journal Of Biochemistry* **271**, 3127-3135.
- Jurat-Fuentes JL, Gould FL, Adang MJ (2003) Dual resistance to Bacillus thuringiensis Cry1Ac and Cry2Aa toxins in Heliothis virescens suggests multiple mechanisms of resistance. *Applied And Environmental Microbiology* **69**, 5898-5906.
- Lacey LA (2007) Bacillus thuringiensis serovariety israelensis and Bacillus sphaericus for mosquito control. *Journal of The American Mosquito Control Association* **23**, 133-163.
- Lacey LA, Siegel JP (2000) Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria. In: Charles J.-F., Delécluse A. and Nielsen-LeRoux C., eds. "Entomopathogenic Bacteria: From laboratory to field application". 253-273.
- Lecadet MM, Blondel MO, Ribier J (1980) Generalized Transduction In Bacillus-Thuringiensis Var Berliner-1715

- Using Bacteriophage-Cp-54ber. *Journal Of General Microbiology* **121**, 203-212.
- Ludlum CT, Felton GW, Duffey SS (1991) Plant Defenses - Chlorogenic Acid And Polyphenol Oxidase Enhance Toxicity Of Bacillus-Thuringiensis Subsp Kurstaki To Heliothis-Zea. *Journal Of Chemical Ecology* **17**, 217-237.
- Maduell P, Armengol G, Llagostera M, Orduz S, Lindow S (2008) B-Thuringiensis is a poor colonist of leaf surfaces. *Microbial Ecology* **55**, 212-219.
- Manceva SD, Pusztai-Carey M, Russo PS, Butko P (2005) A detergent-like mechanism of action of the cytolytic toxin Cyt1A from Bacillus thuringiensis var. israelensis. *Biochemistry* **44**, 589-597.
- Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, *et al.* (2003) Three cadherin alleles associated with resistance to Bacillus thuringiensis in pink bollworm. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **100**, 5004-5009.
- Nauen R (2007) Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Management Science* **63**, 628-633.
- Navon A, Hare JD, Federici BA (1993) Interactions Among Heliothis-Virescens Larvae, Cotton Condensed Tannin And The Cryia(C) Delta-Endotoxin Of Bacillus-Thuringiensis. *Journal Of Chemical Ecology* **19**, 2485-2499.
- Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Johnson D, McGaughey WH (1997) Proteinase-mediated insect resistance to Bacillus thuringiensis toxins. *Journal Of Biological Chemistry* **272**, 23473-23476.
- Paul A, Harrington LC, Zhang L, Scott JG (2005) Insecticide resistance in Culex pipiens from New York. *Journal of The American Mosquito Control Association* **21**, 305-309.
- Perez C, Fernandez LE, Sun JG, *et al.* (2005) Bacillus thuringiensis subsp israelensis Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings of The National Academy of Sciences of The United States of America* **102**, 18303-18308.
- Perez C, Munoz-Garay C, Portugal LC, *et al.* (2007) Bacillus thuringiensis ssp israelensis Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cellular Microbiology* **9**, 2931-2937.
- Pigott CR, Ellar DJ (2007) Role of receptors in Bacillus thuringiensis crystal toxin activity. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* **71**, 255-+.
- Poncet S, Anello G, Delecluse A, Klier A, Rapoport G (1993) Role Of The Cryivd Polypeptide In The Overall Toxicity Of Bacillus-Thuringiensis Subsp Israelensis. *Applied And Environmental Microbiology* **59**, 3928-3930.
- Poncet S, Delecluse A, Klier A, Rapoport G (1995) Evaluation of synergistic interactions among the CryIVa, CryIVb, and CryIVd toxic components of Bacillus-thuringiensis subsp israelensis crystals. *Journal of Invertebrate Pathology* **66**, 131-135.
- Promdonkoy B, Ellar DJ (2003) Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic delta-endotoxin from Bacillus thuringiensis. *Biochemical Journal* **374**, 255-259.
- Regis L, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF (2001) Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends in Parasitology* **17**, 377-380.
- Rukmini V, Reddy CY, Venkateswerlu G (2000) Bacillus thuringiensis crystal delta-endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie* **82**, 109-116.
- Saleh MS, El-Meniawi FA, Kelada NL, Zahran HM (2003) Resistance development in mosquito larvae Culex pipiens to the bacterial agent Bacillus thuringiensis var. israelensis. *Journal of Applied Entomology*-

- 1 *Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie* **127**, 29-32.
- 2 Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, *et al.* (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins.
- 3 *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 775.
- 4 Siqueira HAA, Moellenbeck D, Spencer T, Siegfried BD (2004) Cross-resistance of CryIAb-selected *Ostrinia*
- 5 nubilalis (Lepidoptera: Crambidae) to *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxins. *Journal Of Economic*
- 6 *Entomology* **97**, 1049-1057.
- 7 Tabashnik BE, Liu YB, Finson N, Masson L, Heckel DG (1997) One gene in diamondback moth confers resistance
- 8 to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United*
- 9 *States Of America* **94**, 1640-1644.
- 10 Thomas WE, Ellar DJ (1983) *Bacillus-Thuringiensis-Var-Israelensis* Crystal Delta-Endotoxin - Effects On Insect
- 11 And Mammalian-Cells Invitro And Invivo. *Journal Of Cell Science* **60**, 181-197.
- 12 Tilquin M, Paris M, Reynaud S, *et al.* (2008) Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis
- 13 (Bti) in mosquito natural habitats. *PLoS ONE* **3**, e3432.
- 14 WHO (2005) Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. *Document*
- 15 *WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/13, Geneva, Switzerland, World Health Organization 2005.*
- 16 Wirth MC, Delecluse A, Federici BA, Walton WE (1998) Variable cross-resistance to Cry11B from *Bacillus*
- 17 *thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) resistant to single or
- 18 multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. israelensis. *Applied And Environmental Microbiology* **64**,
- 19 4174-4179.
- 20 Wirth MC, Georgiou GP, Federici BA (1997) CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to
- 21 overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Proceedings Of The*
- 22 *National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **94**, 10536-10540.
- 23 Wirth MC, Walton WE, Delecluse A (2003) Deletion of the Cry11A or the Cyt1A toxin from *Bacillus thuringiensis*
- 24 subsp israelensis: effect on toxicity against resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal*
- 25 *of Invertebrate Pathology* **82**, 133-135.
- 26 Wu D, Federici BA (1993) A 20-Kilodalton Protein Preserves Cell Viability And Promotes CytA Crystal-Formation
- 27 During Sporulation In *Bacillus-Thuringiensis*. *Journal Of Bacteriology* **175**, 5276-5280.
- 28 Wu D, Johnson JJ, Federici BA (1994) Synergism Of Mosquitocidal Toxicity Between CytA And CryIVd Proteins
- 29 Using Inclusions Produced From Cloned Genes Of *Bacillus-Thuringiensis*. *Molecular Microbiology* **13**,
- 30 965-972.
- 31 Zhang HY, Yang CJ, Huang JY, Lu L (2004) Susceptibility of field populations of *Anopheles sinensis* (Diptera:
- 32 Culicidae) to *Bacillus thuringiensis* subsp israelensis. *Biocontrol Science And Technology* **14**, 321-325.
- 33 Zhao JZ, Cao J, Li YX, *et al.* (2003) Transgenic plants expressing two *Bacillus thuringiensis* toxins delay insect
- 34 resistance evolution. *Nature Biotechnology* **21**, 1493-1497.
- 35 Zhao JZ, Li YX, Collins HL, *et al.* (2001) Different cross-resistance patterns in the diamondback moth
- 36 (Lepidoptera: Plutellidae) resistant to *Bacillus thuringiensis* toxin CryIC. *Journal Of Economic Entomology*
- 37 **94**, 1547-1552.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: Evolution of mortality rate to toxic leaf litters during the selection of the LiTOX strain.

Figure 2: Resistance ratio to the three Cry toxin of LiTOX normal and LiTOX_S larvae.
No significant difference between the two groups of larvae was considered when the confidence intervals of resistance ratio at 95 % overlapped.

1 TABLES AND FIGURES

2 Table 1 : Lethal concentrations and resistance ratio of the liTOX strain to toxic leaf litter, commercial *Bti* and *Bti* toxins.

	LC50			LC95		
	susceptible	LiTOX	resistance ratio	susceptible	LiTOX	resistance ratio
toxic leaf litter	14.843 (13.726 - 16.008)	49.885 (46.381 - 53.770)	3.4 (2.9 - 3.9)	34.296 (30.305 - 40.217)	103.215 (91.386 - 120.780)	2.6 (2.0 - 3.6)
Bti	0.112 (0.103 - 0.120)	0.228 (0.211 - 0.247)	2.0 (1.8 - 2.3)	0.238 (0.216 - 0.270)	0.620 (0.527 - 0.770)	3.0
Cry4A	57.321 (41.598 - 82.933)	1731.930 (1039.297 - 3688.640)	30.2 (12.5 - 88.7)	1469.415 (745.292 - 3830.303)	88395.513 (26 187.236 - 674515.394)	60.2 (6.8 - 905.0)
Cry4B	4.390 (2.700 - 6.675)	60.026 (42.830 - 83.733)	13.7 (6.4 - 31.0)	604.494 (270.061 - 1956.160)	2394.329 (1253.467 - 5952.306)	4.0 (0.6 - 22.0)
Cry4A+B	1.373 (1.111 - 1.657)	8.279 (6.445 - 10.607)	6.0 (3.9 - 9.5)	12.282 (8.704 - 19.922)	209.302 (12.313 - 407.564)	17.0 (6.4 - 46.8)
Cry11	8.791 (7.309 - 11.078)	55.181 (48.295 - 63.866)	6.3 (4.4 - 8.7)	56.739 (36.297 - 112.046)	422.197 (308.047 - 636.390)	7.4 (2.7 - 17.5)
Cyt1A	118.068 (100.842 - 136.485)	359.652 (305.818 - 419.051)	3.0 (2.2 - 4.2)	573.497 (449.013 - 798.541)	2454.405 (1803.244 - 3772.118)	4.3 (2.3 - 8.4)

1 Table 2: Dietary particles effects on lethal concentrations and resistance ratio of the LiTOX strain.

	LC50			LC95		
	susceptible	LiTOX	resistance ratio	susceptible	LiTOX	resistance ratio
toxic leaf litter	7.97 (7.28 - 8.64)	28.10 (25.51 - 30.69)	3.5 (3 - 4.2)	15.96 (14.27 - 18.5)	64.69 (56.19 - 77.33)	4.1 (1.7 - 2.4)
<i>Bti</i>	0.10 (0.09 - 0.11)	0.20 (0.19 - 0.22)	2 (1.7 - 2.4)	0.32 (0.26 - 0.41)	0.58 (0.49 - 0.72)	1.8 (3 - 4.2)
<i>Bti</i> + non toxic litter	0.13 (0.12 - 0.15)	0.30 (0.28 - 0.33)	2.3 (1.9 - 2.8)	0.38 (0.32 - 0.48)	0.58 (0.50 - 0.72)	1.5 (1.9 - 2.8)
<i>Bti</i> + larval food	0.11 (0.11 - 0.12)	0.26 (0.24 - 0.28)	2.4 (2 - 2.5)	0.25 (0.22 - 0.29)	0.45 (0.41 - 0.52)	1.8 (2 - 2.5)

2

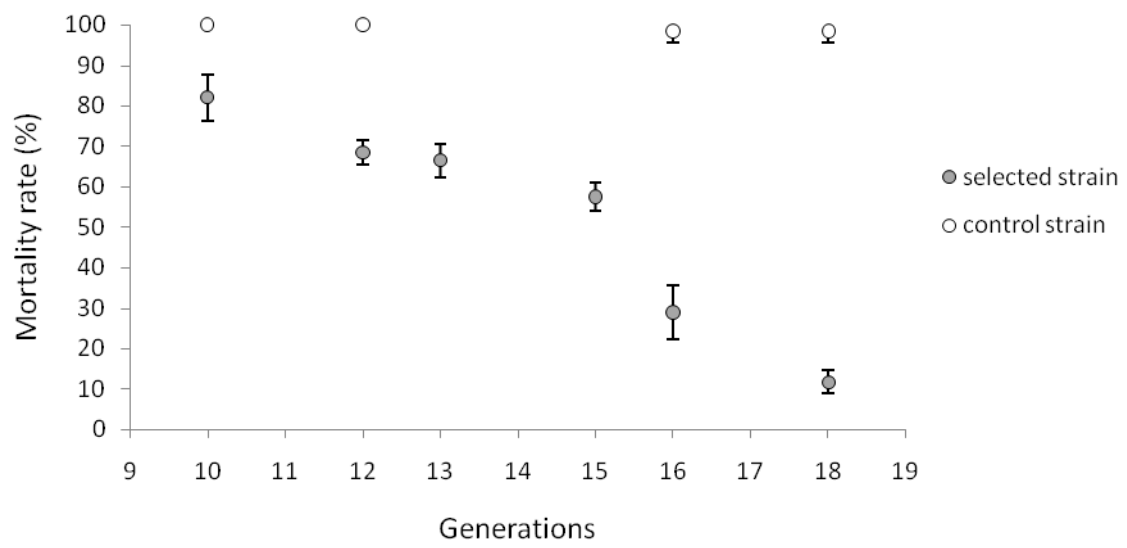


Figure 1.

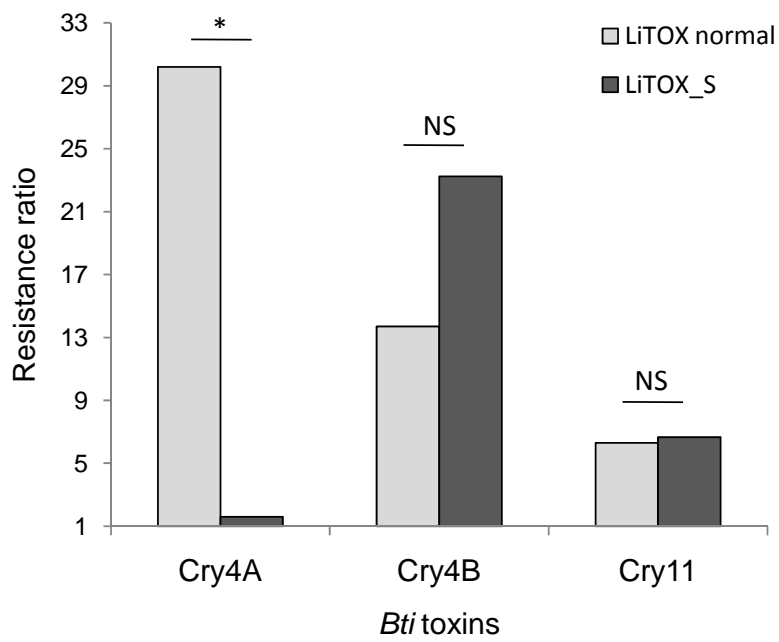


Figure 2.

Chapitre 3- Recherche des bases moléculaires de la résistance aux toxines du *Bti*

I- Scan génomique à l'aide de marqueurs AFLP

Une approche par scan génomique a été choisie afin de rechercher les gènes impliqués dans la résistance aux toxines de *Bti* chez la souche d'*Aedes aegypti* LiTOX. Cette approche consiste à cribler le génome du moustique avec un grand nombre de marqueurs moléculaires d'individus provenant des souches résistante et sensible, et de détecter les marqueurs présentant une forte différenciation génétique entre les deux souches.

I.1- Génotypage des marqueurs AFLP

Afin d'obtenir de l'ADN de bonne qualité, l'ADN génomique a été extrait à partir de larves vivantes. Avant l'extraction, le tube digestif de chaque larve a été disséqué et retiré afin d'éviter les contaminations par de l'ADN issu de la nourriture ou des bactéries contenues dans le tube digestif. L'extraction a été effectuée avec un Kit commercial (DNeasy tissue Kit, Qiagen) et la concentration d'ADN a été mesurée par microspectrophotométrie à 260nm pour chaque échantillon avec le NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). Chaque échantillon a ensuite été dilué afin d'obtenir une concentration homogène de 50 ng/μl.

Le génotypage AFLP a été effectué à partir de 150ng d'ADN. Le protocole standard AFLP de digestion/ligation initialement décrit par Vos et al. (1995) n'a pas permis d'obtenir des profils de bonne qualité chez les moustiques. J'ai donc mis en place un protocole mieux adapté, en séparant les deux étapes de digestion et la ligation. Brièvement, il implique une première étape de digestion de 2.5 h avec 2U de l'enzyme MseI, puis une deuxième étape de digestion de 2.5 h avec 5U de l'enzyme EcoRI, et enfin une étape de ligation de 2.5 h avec 1U de l'enzyme T4 DNA ligase. Les fragments de restrictions sont ensuite amplifiés par une PCR pré-sélective (avec 1 base sélective par amorce), puis par une PCR sélective en utilisant trois bases sélectives par amorce. Pour plus de détails, le protocole AFLP modifié est décrit dans l'article n°7 (chapitre 5 de cette thèse). Les produits des PCR sélectives ont ensuite été séparés par électrophorèse par un séquenceur à capillaire ABI 3130 (Applied Biosystems). Les profils AFLP ont été analysés grâce au logiciel GeneMapper V3.7 software (Applied Biosystems). Au total, 432 marqueurs polymorphes compris entre 50 et 500 pb ont été codés

en une matrice de présence/absence (0/1) pour 23 individus de la souche sensible et 26 individus de la souche résistante LiTOX. La répétabilité de l'ensemble du génotypage AFLP a été estimée à 97.3 % grâce à la répétition de 10 individus choisis aléatoirement comme recommandé par Bonin et al. (2004).

1.2- Différenciation génétique entre les deux souches analysées

La différenciation génétique entre les deux souches a été estimée avec le logiciel AFLP-SURV (Vekemans 2002) par le F_{ST} de Weir & Cockerham (1984), avec un intervalle de confiance à 95 % obtenu grâce à 1000 bootstraps. Après 18 générations, les deux souches présentent une **différenciation génétique relativement forte** : $F_{ST} = 0.1140$ (CI 95% = 0.1051 - 0.1256). Le pourcentage de loci polymorphes est beaucoup plus faible chez la souche LiTOX (67.7 %) que chez la souche sensible (93.1 %), indiquant une **diminution de la diversité génétique** chez la souche LiTOX.

Tableau n°1 : Scénario démographique de la souche LiTOX. Une introgression moyenne de 2.5 % d'individus sensibles par génération été réalisée. *A cause de la forte baisse démographique observée à la génération 10, la sélection a été interrompue pendant deux générations.

Génération	Sélection	Effectif de la population
0 (Souche sensible)	Oui	6000
1	Oui	300
2	Oui	300
3	Oui	300
4	Oui	300
5	Oui	300
6	Oui	300
7	Oui	300
8	Oui	300
9	Oui	300
10	Non*	25
11	Non*	1000
12	Oui	1000
13	Oui	1000
14	Oui	1000
15	Oui	1000
16	Oui	1000
17	Oui	1000
18	Oui	1000
19	Oui	1000
20	Oui	2000

Cette faible variabilité génétique peut avoir plusieurs origines :

- les goulots d'étranglement dus à la sélection et la réduction du nombre d'adultes reproducteurs par rapport à la souche sensible, augmentant les effets de dérive génétique (tableau n°1)
- la sélection de certains allèles d'intérêt contribue à diminuer leur diversité
- la baisse de diversité dans les régions génomiques liées aux gènes sous sélection par effet 'autostop'.

Une analyse en coordonnées principales (PCoA) a été effectuée à partir des données AFLP afin de visualiser en deux dimensions la diversité et la différenciation génétique entre les souches (figure 1). Tout d'abord, les individus de la souche LiTOX sont très regroupés par rapport aux individus de la souche sensible, ce qui reflète une plus faible variabilité génétique. Au-delà de cette baisse de diversité attendue, les deux nuages de points sont clairement distincts, ce qui suggère que la diversité génétique de la souche LiTOX n'est pas simplement un sous-ensemble de la diversité génétique initiale. Ce résultat indique que la sélection avec les toxines du *Bti* n'a pas sélectionné seulement des allèles particuliers chez la souche LiTOX, mais surtout de **nouvelles combinaisons alléliques** non présentes chez la souche d'origine.

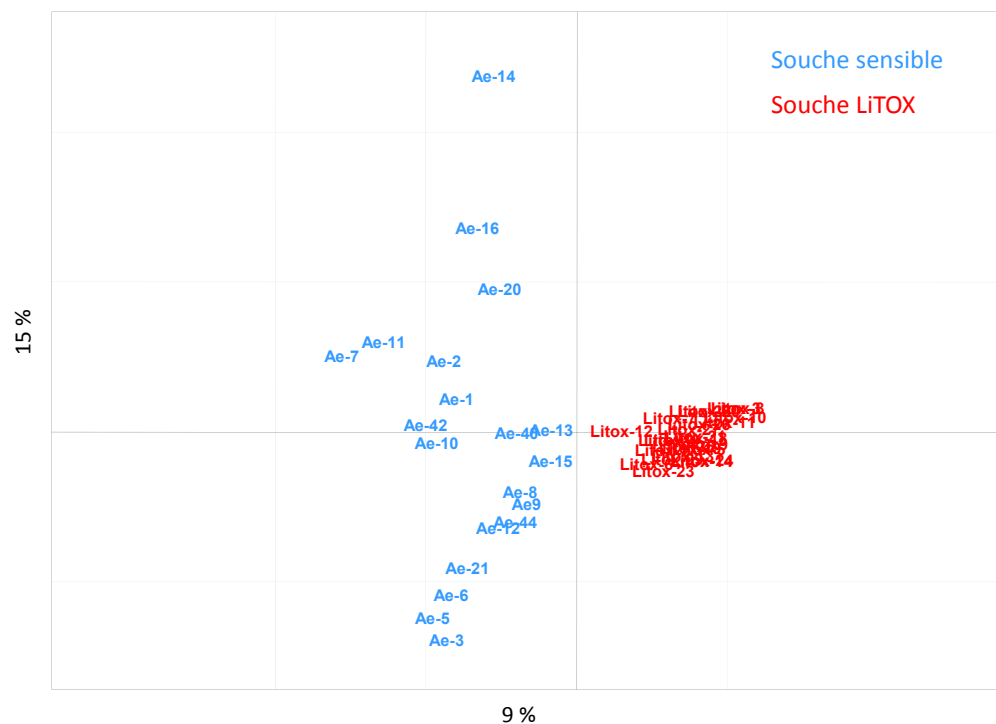


Figure 1 : PCoA représentant les individus de la souche sensibles (en bleu) et de la souche LiTOX (en rouge). Les deux premiers axes représentent 14% de la diversité génétique.

I.3- Détection des loci AFLP outliers

Afin de détecter les marqueurs AFLP présentant une signature de sélection (marqueurs *outliers*), deux méthodes ont été utilisées : la méthode de Beaumont & Nichols (1996) implémentée dans le logiciel Dfdist et la méthode de Foll & Gaggiotti (2008) implémentée dans le logiciel BayeScan. **Dix huit marqueurs outliers** ont été détectés en dehors de l'intervalle à 95% et 5 à 99% avec Dfdist (figure n°2), dont 6 ont également été détectés avec une probabilité supérieure à 95% avec BayeScan.

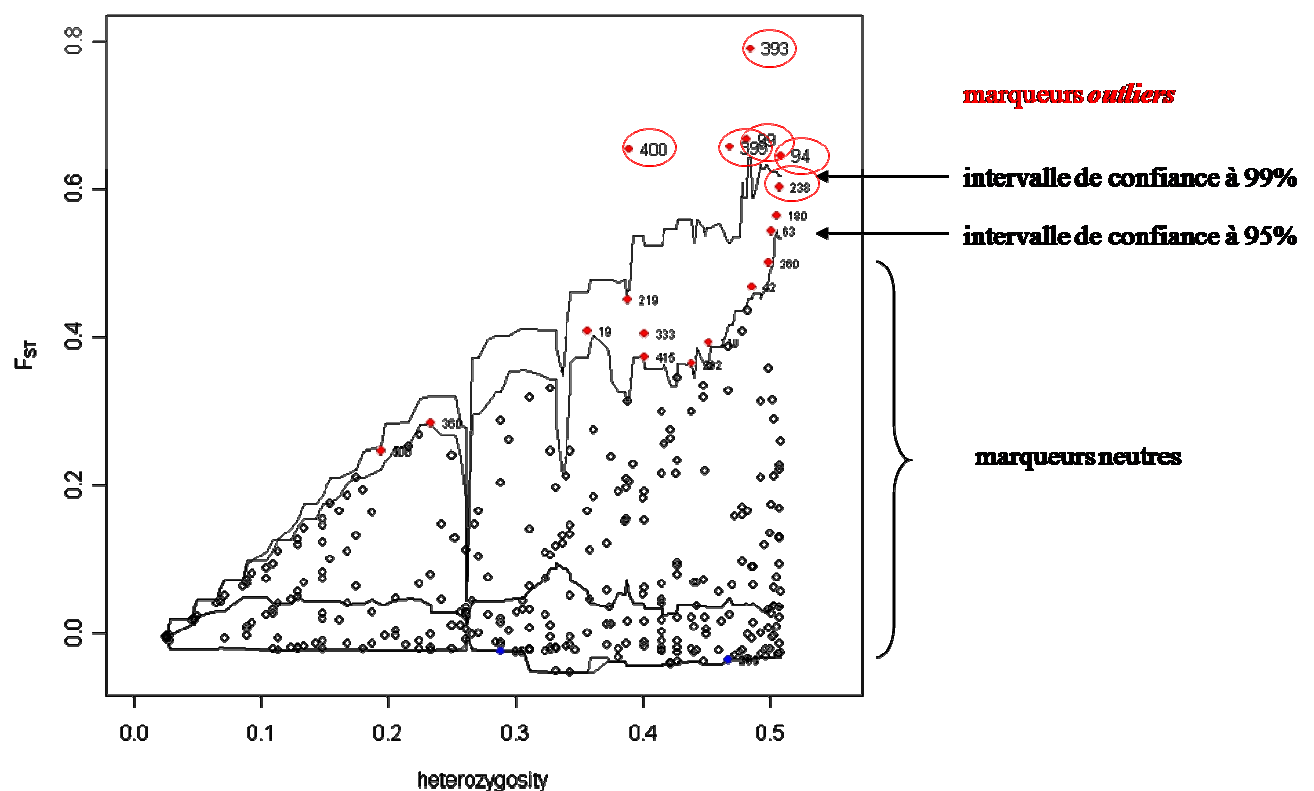


Figure 2 : Représentation graphique de l'analyse effectuée avec Dfdist. Les valeurs de F_{ST} de chacun des marqueurs sont indiquées par rapport à la valeur estimée de leur hétérozygotie. Les enveloppes de neutralité à 95 et 99% sont également représentées. Les marqueurs *outliers* sont indiqués par des points rouges. Les six marqueurs également détectés à 95 % par le logiciel BayeScan sont entourés en rouge.

I.4- Séquençage des loci outliers

Les AFLP ont l'inconvénient de produire lors de la même réaction plusieurs dizaines de marqueurs anonymes, ne permettant pas leur séquençage individuel de façon classique. Or le séquençage des marqueurs *outliers* est une étape primordiale afin de détecter les régions du génome potentiellement impliquées dans la résistance. La stratégie a été d'utiliser les nouvelles technologies de séquençage haut débit qui permettent d'obtenir de très nombreuses

séquences à partir d'ADN en mélange. **Le séquençage par la méthode 454 Life Science** développé par Roche apparait le mieux adapté pour le séquençage des AFLP car il produit des centaines de milliers de séquences de plusieurs centaines de pb par « run ».

1.4.1- Validation de la méthode

Une étape de validation du séquençage des profils AFLP par cette méthode a tout d'abord été nécessaire. Pour cela j'ai utilisé **l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana*** dont le génome est entièrement séquencé et assemblé. Cette espèce offre surtout l'avantage d'être autogame et de présenter une séquence d'ADN identique chez tous les individus d'un même écotype. Il est donc facile de se procurer un individu de l'écotype Columbia possédant le même génome que celui disponible dans les bases de données. L'objectif a été de comparer les profils AFLP obtenus expérimentalement 1/ de façon classique et 2/ en utilisant le séquençage haut débit avec les profils AFLP attendus chez cette espèce. Pour cela, **le logiciel ISIF (In Silico Fingerprinting)** permettant d'obtenir des profils AFLP *in silico* a été développé (article 3 : Paris et al., accepté). Ce logiciel, disponible sur le site internet du LECA (<http://www-leca.ujf-grenoble.fr/logiciels.htm>), permet d'obtenir la séquence, la taille et la position sur le génome des fragments AFLP susceptibles d'être obtenus avec un couple d'amorces donné. Le couple d'amorce EcoRI+ATG/MseI+ATG a été choisi parmi une centaine de couples d'amorces testés car il produit un nombre restreint de fragment AFLP (20 fragments) relativement bien répartis entre 50 et 400 pb.

Un profil AFLP a été obtenu de façon classique pour ce couple d'amorce en suivant le protocole décrit précédemment. En parallèle, un produit de PCR sélective a été obtenu avec le même couple d'amorce et séquencé avec le 454 Life Science en suivant le protocole GS 20 (Roche Applied Science). Environ 6000 séquences ont été obtenues pour cet échantillon et analysées.

1.4.2- Analyse des données de séquençage

Une étape de **multiplexage des individus** a été indispensable pour notre étude car la technologie 454 permet d'obtenir plusieurs centaines de milliers de séquences au total, alors que seulement quelques milliers sont nécessaires pour analyser le profil AFLP d'un individu. Afin de différencier les individus, les amorces de PCR sélective ont été prolongées en 5' par un motif de 4 nucléotides (tag). L'ajout de tags individu-spécifiques permet de mélanger les individus en 1 seul run 454 et d'identifier *a posteriori* leurs séquences.

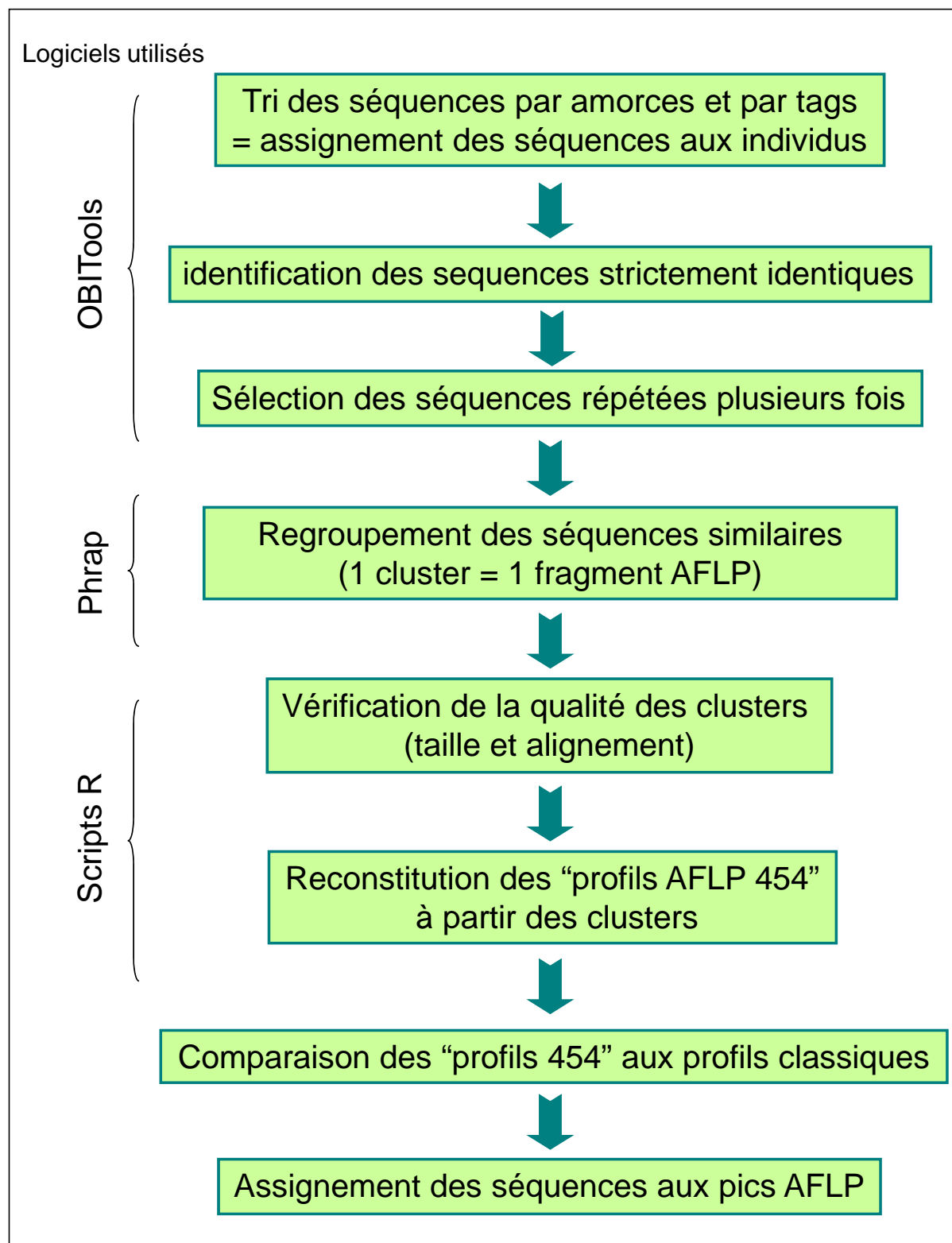


Figure 3 : Méthode de tri et d’analyse des séquences obtenues avec le séquençage 454.

L’analyse des milliers de séquences obtenues grâce au pyroséquençage 454 a été effectuée principalement grâce à des scripts python développés au laboratoire par Eric

Coissac pour l'analyse de larges fichiers de séquences (disponible gratuitement à <http://www.grenoble.prabi.fr/trac/OBITools>) ou grâce à des scripts R (figure 3).

Les séquences sont tout d'abord triées par amorces et par tags et assignées aux individus auxquelles elles correspondent. Les fichiers commençant par l'amorce MseI sont ensuite reverse-complémentés afin que toutes les séquences commencent par l'amorce EcoRI. Les séquences strictement identiques sont ensuite détectées ; parmi elles, une seule est gardée et le nombre total de séquences identiques est enregistré dans ses attributs. Cette étape permet d'une part de réduire considérablement le nombre de séquences à analyser par la suite, et d'autre part d'obtenir la fréquence de chacune des séquences.

Analyser directement les séquences identiques générées par le pyroséquençage 454 n'est pas possible, car les **erreurs de séquençage** produisent de nombreux variants pour chaque fragment AFLP. De plus, lorsque l'on travaille avec des individus diploïdes, l'**hétérozygotie** peut créer des séquences différentes pour un même fragment AFLP chez un même individu. Par exemple la figure n°4 présente 19 variants obtenus pour un fragment de 98 pb chez un individu l'espèce *Ae. aegypti*. Le nombre de répétition de chaque séquence est indiqué à leur gauche. Les deux premières séquences sont majoritaires et correspondent à deux allèles. Ensuite, les variations dans les séquences suivantes peuvent être dues soit à des erreurs de séquençage, soit à l'obtention de séquences incomplètes (figure 4). Globalement, les séquences présentant des erreurs de séquençage sont minoritaires dans les jeux de données et sont le plus souvent répétées une seule fois. Retirer des jeux de données les séquences très peu répétées permet donc d'éliminer la majorité des erreurs de séquençage.

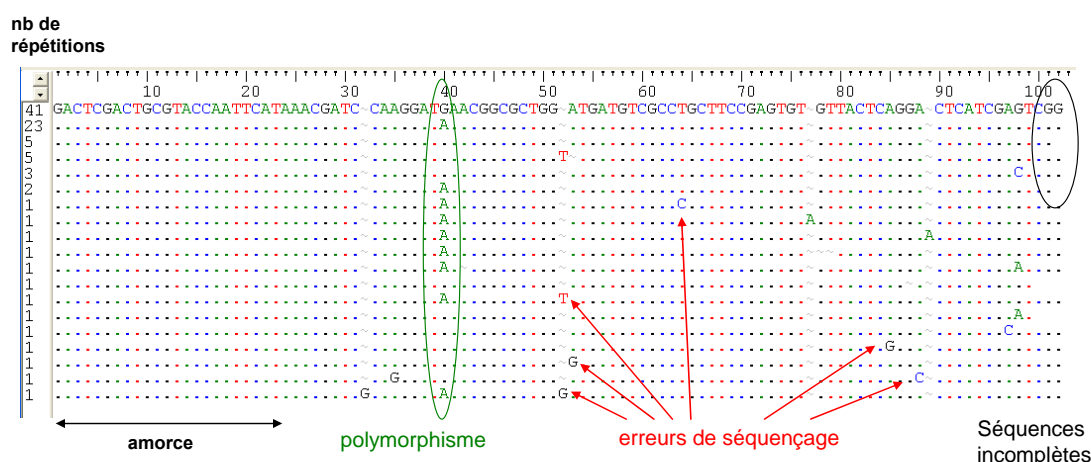


Figure 4 : Nombre et séquences de 19 variants obtenus pour un même fragment AFLP (visualisation avec le logiciel BioEdit).

Les séquences sont ensuite regroupées en clusters grâce au logiciel Phrap. Chaque cluster comprend les différents variants pour un fragment AFLP donné. Ce logiciel produit des fichiers regroupant toutes les séquences par clusters, ainsi qu'un fichier global regroupant les séquences consensus de chacun des clusters identifiés. Cependant, ce logiciel ne détecte pas les insertions comme des erreurs de séquençage et les inclut dans les séquences consensus, biaisant ainsi leur taille. Or, une bonne précision de la taille des séquences obtenue est indispensable pour pouvoir relier les clusters obtenus avec les pics des fragments AFLP observés par électrophorèse. Pour obtenir des séquences consensus et mesurer la taille des clusters de façon non biaisée, des scripts R sont ensuite utilisés pour chacun des clusters. Enfin les **profils « AFLP 454 »** sont créés à partir des séquences consensus des clusters obtenus (nombre de séquences et taille, figure 5).

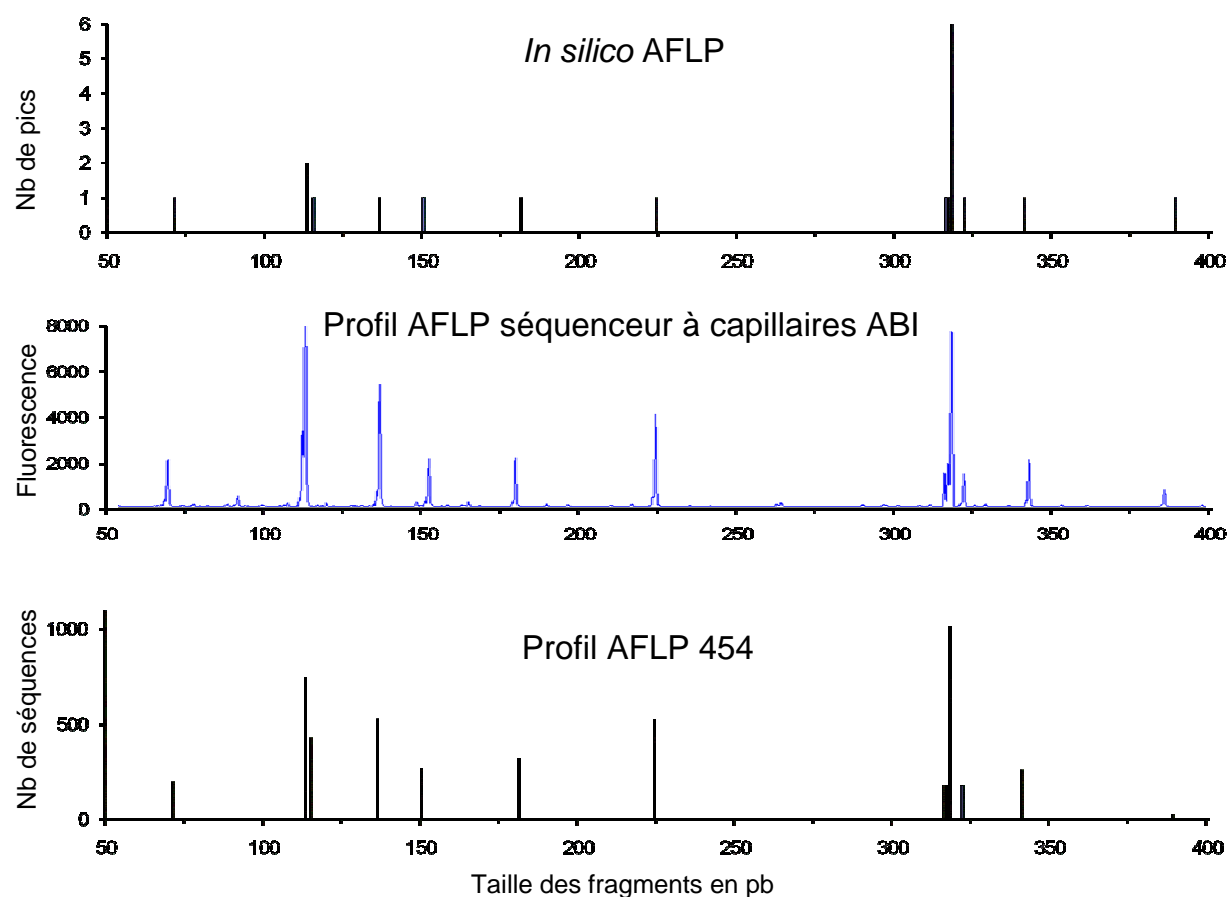


Figure 5 : Comparaison des profils AFLP obtenus chez l'espèce modèle *Arabidopsis thaliana* pour le couple d'amorce EcoRI+ATG/MseI+ATG avec 3 méthodes : *in silico*, après électrophorèse à capillaire et après pyroséquençage 454.

Nos résultats ont montré une **très bonne concordance entre les profils** obtenus avec les 3 méthodes utilisées (figure 5). De plus, les séquences obtenues avec le séquençage haut débit correspondent parfaitement aux séquences attendues produites *in silico*. Ces résultats indiquent :

- que la méthode d'AFLP classique est fiable,
- que le séquençage haut débit, grâce au 454 Life Science, permet d'obtenir de façon fiable les données de séquences des fragments de restriction AFLP,
- que l'intensité des pics AFLP semble corrélée au nombre de séquences correspondantes obtenues au 454. Obtenir un nombre de séquences élevé pour des pics de faible intensité sera donc plus difficile ; c'est principalement le cas pour les pics de grande taille en pb.
- que la taille des pics AFLP mesurée par électrophorèse capillaire ne correspond pas à la taille réelle des séquences et est souvent biaisées de plus ou moins 3 pb.

Cette méthode a également été testée avec succès sur des espèces non-modèles de plantes (*Arabis alpina*), d'insectes (*Aedes rusticus*) et de mammifères (*Ursus arctos*, *Ursus maritimus*).

I.4.3- Séquençage des loci outliers identifiés chez la souche résistante LiTOX

Les produits de PCR sélective ont été séquencés pour 18 individus afin d'obtenir les séquences des loci AFLP *outliers* identifiés entre la souche sensible et la souche LiTOX d'*Ae. aegypti*. La stratégie a été de choisir pour chacun des *outliers* deux individus le possédant et deux individus ne le possédant. Les produits de PCR ont été purifiés avec le Kit « MinElute PCR purification » (Qiagen). L'ADN a ensuite été quantifié grâce au BioAnalyser (Agilent), puis mélangé afin d'obtenir environ 4000 séquences par individu.

Une moyenne d'environ 4000 séquences a été obtenue pour chacun des 18 individus séquencés. La méthode d'analyse décrite précédemment été appliquée pour obtenir les profils « AFLP 454 » de chacun des individus. La figure n°6 représente comment une comparaison entre les profils obtenus par électrophorèse et les profils obtenus grâce aux séquences issues du pyroséquençage 454 permet d'assigner une séquence à chacun des pics AFLP *outliers*. Dans le cas présenté, les quatre individus choisis permettent d'obtenir des profils contrastés pour 3 des 18 loci *outliers* (les marqueurs 393, 399 et 400 indiqués en bleu). La correspondance entre les profils est relativement bonne malgré la grande taille des fragments

séquencés (270-300 pb). Cette méthode a permis d'obtenir la séquence des 5 *outliers* détectés à 99% avec Dfdist et de 3 *outliers* sur les 13 détectés entre 95% et 99%.

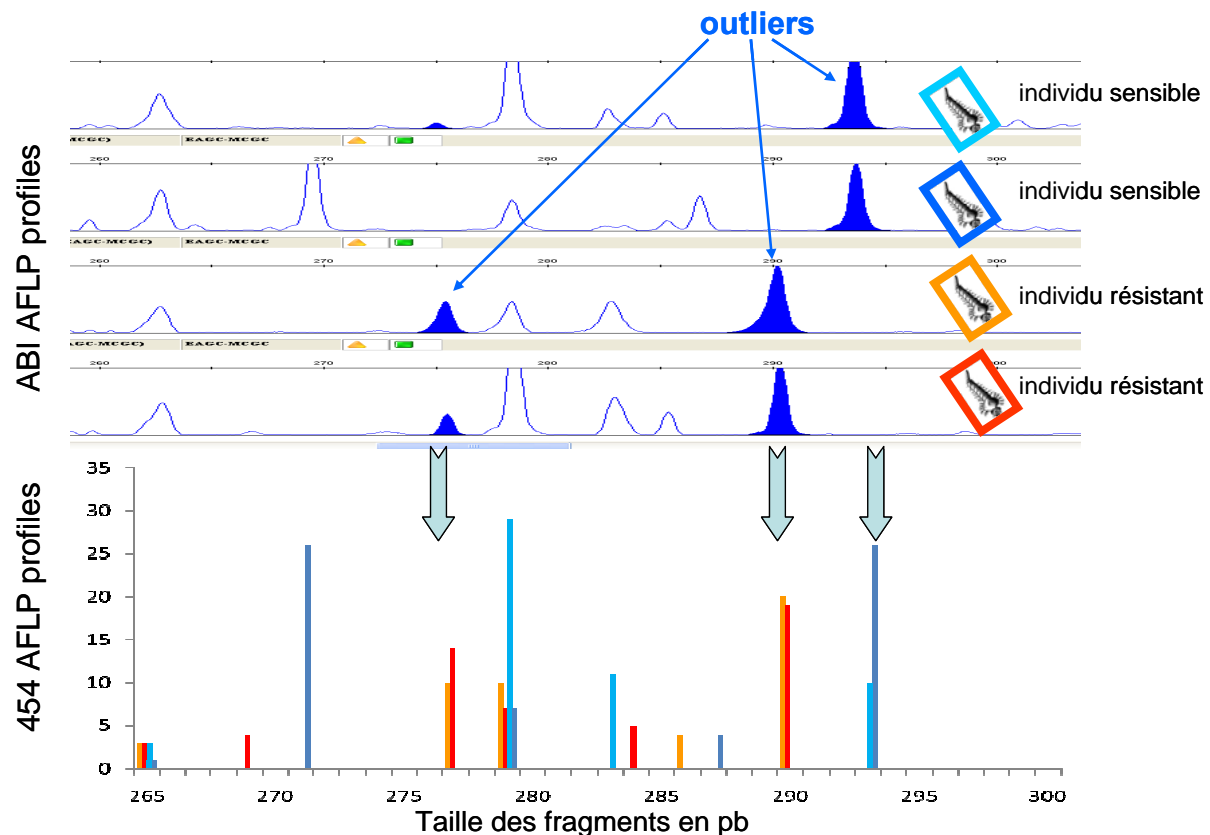


Figure 6 : Identification des séquences de 3 *outliers* par comparaison entre les profils AFLP obtenus par électrophorèse avec ceux obtenus par pyroséquençage 454.

Cette méthode atteint néanmoins ses limites lorsqu'il s'agit d'assigner une séquence à des *outliers* de grande taille (>300 pb), ou au contraire de petite taille (70-150 pb). En effet, au moment de ces analyses, le 454 permettait d'obtenir des séquences de 200-240 pb au maximum. En analysant les séquences incomplètes commençant par chacune des deux amorces, on peut espérer reconstituer des séquences complètes d'environ 400 pb au maximum. Ainsi, pour certains *outliers* de grande taille, nous n'avons pas pu obtenir les séquences avec cette méthode. C'est le cas par exemple des *outliers* 333 ou 238 qui font respectivement 420 et 469 pb. De plus, en raison de biais de PCR, les fragments de grande taille sont moins facilement amplifiés et sont représentés par très peu de séquences dans les jeux de données issues du pyroséquençage 454. Les évolutions récentes de cette technique de pyroséquençage permettent aujourd'hui d'obtenir des séquences de plus de 400 pb et de pallier à ce problème.

En ce qui concerne les *outliers* de petite taille, les pics générés par AFLP sont distribués de façon non-homogène, avec une forte concentration de pics de taille comprise entre 50 et 150 pb. Ces **pics de petite taille sont souvent homoplasiques**, c'est-à-dire qu'ils sont constitués de plusieurs séquences différentes qui co-migrent car elles sont de même taille. Pour certains *outliers* de petite taille, plusieurs séquences potentielles sont identifiées. De plus, la taille des pics AFLP mesurée par électrophorèse ne correspond pas toujours à la taille réelle des séquences des fragments AFLP. C'est le cas par exemple de l'*outlier* 19 de 111 pb, pour lequel 3 séquences différentes d'ADN de tailles proches peuvent être identifiées. Pour ces loci *outliers*, utiliser la méthode de réduction des profils AFLP décrite en introduction permettra de déterminer les 6 premiers nucléotides de la séquence de chaque pic et de leur attribuer ainsi la bonne séquence. La **méthode de réduction des profils AFLP** sera également utilisée afin de valider chacune des séquences *outliers* obtenues par le pyroséquençage 454. Une bonne validation de ces séquences est très importante car ce sont elles qui vont permettre de détecter les régions sous sélection et les gènes candidats à étudier par la suite. Des erreurs à ce stade seraient donc très coûteuses en temps et en argent pour la suite du projet. Cette méthode a déjà permis la validation de la séquence du marqueur *outlier* n°94.

1.5- Localisation des loci outliers et recherche de gènes candidats à proximité

Une fois les séquences des loci *outliers* identifiées, elles ont été comparées au **génom**
sé
é
q
u
e
n
c
e
d
e
d'
Ae.
aegypti
grâce au site internet « VectorBase » (<http://www.vectorbase.org/index.php>) regroupant les bases de données de cinq insectes vecteurs de maladies. A l'heure actuelle, le génome d'*Ae. aegypti* de la souche Liverpool est entièrement séquencé et assemblé en 4758 supercontigs, cependant, l'assemblage complet n'est encore disponible. Sept des 8 loci *outliers* ont pu être **localisés de façon précise** sur le génome d'*Ae. aegypti*, chacun sur un supercontig différent (tableau 2). Tous sont localisés dans des régions annotées comme non-codantes du génome. L'*outlier* n° 19 correspond à une séquence répétée de nombreuses fois dans le génome et n'a donc pas pu être localisé. Le fait que les loci *outliers* ne soient pas regroupés sur les mêmes supercontigs, indique que **des traces de sélection sont détectables dans de nombreuses régions du génome**. Ce résultat n'est pas étonnant vu la complexité des mécanismes impliqués dans la résistance au *Bti*. Ainsi, la résistance a vraisemblablement une origine multigénique.

Chez *Ae. aegypti*, 15 988 gènes sont annotés et répartis sur seulement 1651 supercontigs, et le nombre de gène dans ces supercontigs est très variable : de 175 gènes maximum pour le supercontig 1.102 à un seul gène pour environ un quart des supercontigs. Malheureusement, la fonction de la moitié de ces gènes reste encore inconnue, ce qui ne facilite pas la caractérisation **des gènes candidats** impliqués dans la résistance au *Bti*. Pour ce travail, j'ai considéré comme **gènes candidats** :

- les familles de récepteurs décrits dans la résistance aux toxines Cry dans la littérature,
- les sérines protéases (comprenant les trypsines et les chymotrypsines) impliquées dans l'activation ou la dégradation des toxines Cry, ainsi que leurs inhibiteurs,
- les gènes du système immunitaires connus pour conférer de la résistance au *Bt*,
- les actines qui peuvent également être impliquées dans la fixation des toxines Cry.

Un total de 300 gènes candidats a été identifié dans le génome annoté d'*Ae.aegypti* de cette manière (Tableau2).

Mécanismes de résistance	Familles de gènes	Nombre de gènes annotés
Récepteurs membranaires	cadhérines	17
	aminopeptidases	19
	alkalines phosphatases	14
	galactosidases	5
	glycosyl transférases	
	(voie de biosynthèse des récepteurs)	13
Protéases	trypsines	82
	chymotrypsines	6
	sérines proteases	87
	sérines proteases inhibiteurs	23
Système immunitaire	mitogen-activated proteines kinases	5
Autre	actines	29
Total	11	300

Tableau 2 : Liste des 300 gènes candidats à la résistance au *Bti* annotés sur le génome d'*Aedes aegypti*.

Parmi les 7 *outliers* localisés sur le génome d'*Ae. aegypti*, 3 se trouvent à proximité de gènes codant pour des protéases, 1 se trouve sur le même supercontig que quatre Beta-galactosidases décrites comme récepteurs des toxines Cry chez les nématodes (Griffitts et al. 2005) et 1 se trouve sur le même supercontig que trois cytochromes P450 (tableau 2).

Outlier	Supercontig	Nb. De gènes annotés dans le supercontig	Gènes candidats sur le supercontig		
			Protéases	Récepteurs	Détoxication
94	1.123	43	1	4	
99	1.75	10			
394	1.174	30			3
400	1.838	2			
110	1.212	9	2		
63	1.759	7	1		
401	1.5	8			

Tableau 2 : Localisation des loci *outliers* AFLP sur les supercontigs constituant le génome d'*Ae. aegypti* et gènes candidats détectés dans ces supercontigs.

Une analyse plus précise de ces gènes est donc envisagée : 1/ en recherchant des traces de sélection dans leur séquence, 2/ en recherchant des mutations diagnostiques entre les souches sensible et résistante et 3/ en comparant l'expression de ces gènes entre les deux souches.

1.2- Contribution sous forme d'article

Article 3: PARIS M, BONNES B, FICETOLA GF, PONCET B, DESPRES L. Amplified fragment length homoplasy: *in silico* analysis for model and non-model species. *BMC Genomics*, 11 :287.

Chapitre 3 - Article 3

Amplified fragment length homoplasy: *in silico* analysis for model and non-model species.

PARIS M, BONNES B, FICETOLA GF, PONCET B, DESPRES L

BMC Genomics (2010) 11 :287.

METHODOLOGY ARTICLE

Open Access

Amplified fragment length homoplasy: *in silico* analysis for model and non-model species

Margot Paris*, Benjamin Bonnes, Gentile Francesco Ficetola, Bénédicte N Poncet and Laurence Després

Abstract

Background: AFLP markers are widely used in evolutionary genetics and ecology. However the frequent occurrence of non-homologous co-migrating fragments (homoplasy) both at the intra- and inter-individual levels in AFLP data sets is known to skew key parameters in population genetics. Geneticists can take advantage of the growing number of full genome sequences available for model species to study AFLP homoplasy and to predict it in non-model species.

Results: In this study we performed *in silico* AFLPs on the complete genome of three model species to predict intra-individual homoplasy in a prokaryote (*Bacillus thuringiensis* ser. *konkukian*), a plant (*Arabidopsis thaliana*) and an animal (*Aedes aegypti*). In addition, we compared *in silico* AFLPs to empirical data obtained from three related non-model species (*Bacillus thuringiensis* ser. *israelensis*, *Arabis alpina* and *Aedes rusticus*). Our results show that homoplasy rate sharply increases with the number of peaks per profile. However, for a given number of peaks per profile, genome size or taxonomical range had no effect on homoplasy. Furthermore, the number of co-migrating fragments in a single peak was dependent on the genome richness in repetitive sequences: we found up to 582 co-migrating fragments in *Ae. aegypti*. Finally, we show that *in silico* AFLPs can help to accurately predict AFLP profiles in related non-model species.

Conclusions: These predictions can be used to tackle current issues in the planning of AFLP studies by limiting homoplasy rate and population genetic estimation bias. ISIF (In Silico Fingerprinting) program is freely available at <http://www-leca.ujf-grenoble.fr/logiciels.htm>.

Background

Many key questions in evolutionary genetics and ecology cannot be addressed solely using model species, and until recently, the genomic study of non-model species (ecogenomics [1,2]) was limited by the lack of genomic information available. However, the taxonomical range of model species for which whole genome sequences are readily available in databases is already wide and is rapidly expanding. The genomic resources already available can constitute a key tool for molecular ecologists, to optimize experimental design and decrypt the genetics of related non-model species [3,4]. Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP) [5] is one of the most extensively used DNA fingerprinting methods and has many applications on model and non-model species, such as inferring genetic structure, genetic diversity, demogra-

phy, phylogeny, genotyping, gene mapping or genome scan analyses [6-11]. Genomic DNA is digested into thousands of fragments using restriction enzymes. A subset of the genomic restriction fragments is PCR amplified using primers with 1 - 4 selective bases each, thereby reducing the number of fragments on the profile. The fragments are separated lengthwise using electrophoresis, and discrete peaks can be visualized on a typical AFLP profile. Each discrete peak position is scored, i.e. characterized as a biallelic locus (coded 0/1) in a 50 - 500 bp range [11]. This technique is based on the assumption that co-migrating fragments of the same length are homologous and come from the same chromosomal region. In practice, this assumption is not systematically tested [12].

The quality of the AFLP result (i.e. the profile) is determined by several factors, including the number of peaks detected and their length distribution. The AFLP method usually produces 40 - 200 peaks per profile [7]. A large number of peaks in a profile increases the probability of

* Correspondence: margotparis1@gmail.com

¹ Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS-UMR 5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France

Full list of author information is available at the end of the article

detecting genetic polymorphism, but also the probability of poorly separated unscorable peaks and homoplasy. Homoplasy occurs when non-identical fragments originating from different loci in the genome co-migrate [12].

Peak homoplasy can arise through two major processes in AFLP data sets. First, at the individual level, an AFLP peak can contain several non-identical co-migrating fragments which co-migrate by chance, or because they share similar sequences but not the same location in the genome (repeated DNA). These fragments with high similarity could be orthologous or paralogous copies of genes, pseudogenes, transposable elements, or repetitive sequences with unknown functions [13]. Second, at the inter-individual level, AFLP peaks of the same length in two different profiles are not necessarily homologous [13-15]. Additionally, homoplasy between individuals can be increased artificially during the scoring. This "technical homoplasy" has recently been described by Arrigo et al. [16] which recommended AFLP scoring procedures minimizing this bias. Caballero et al. [17] recently used a theoretical approach to estimate biases due to co-migrating fragments in population genetic analyses based on AFLP data. They found that inter-individual homoplasy causes overestimation of allele frequencies, underestimation of the degree of differentiation between subpopulations and reduces the performance of genomic scan when detecting loci under selection. Furthermore, intra-individual homoplasy can also affect the estimation of genetic estimators [18,19]. Evaluating and limiting homoplasy in data sets used for population genetic inference and genome scan analysis is therefore of primary importance.

Few studies have attempted to estimate the proportion of co-migrating AFLP fragments in a profile or between individuals either directly by sequencing peaks [15,20-23], or indirectly by comparing AFLP patterns resulting from several runs of selective amplification using primers with an additional nucleotide [14,24], by modeling the fragments' length distribution [12,25] or by performing *in silico* AFLP [13,26]. These studies established that homoplasy is frequent in most AFLP data sets and is higher in short peaks or when many AFLP peaks are generated. In the rare studies evaluating the proportion of co-migrating fragments, homoplasy ranged from 4% in individuals up to 100% across species from distantly related taxa.

At the individual level, the number of peaks and the clarity of the profiles are strongly dependent on the selection of restriction enzymes and on the number and the sequence of selective bases. For most studies on plant and animal genomes, the restriction enzyme combination EcoRI/MseI and three selective bases for each primer are used [7,27]. For larger or polyploid genomes, a two-step amplification procedure using 4 selective bases is recommended [28,29]. On the other hand, for small bacterial

and fungal genomes, a single amplification with one or two selective nucleotides is sufficient [30,31]. Moreover, the nucleotide composition of the selective bases influences the number of amplified fragments and their length distribution [26,32] thereby affecting homoplasy. For example, the use of A/T selective bases results in an over-representation of shorter fragments in *Arabidopsis thaliana* [26].

Although all these factors have an important influence on the AFLP profiles, it is difficult to foresee which combinations of enzymes and selective bases will be the most informative for the AFLP study of non-model species. The most commonly used method is to first test a large amount of primer combinations on a sub-sample of representative individuals before performing the whole population analysis using a few selected primer combinations, but this process can be time consuming and expensive. Another approach is the use of bioinformatics, to take advantage of the exponentially growing number of full genome sequences available, for example by performing *in silico* AFLPs [33-35].

In silico AFLPs simulate the AFLP experimental process on a full sequenced genome and provides the length of the virtual fragments, their sequences and their positions along the genome at no cost. In this study, we first validated this approach by showing the consistency between *in silico* and experimental AFLPs on the model species *Arabidopsis thaliana*. We also examined whether the fluorescence intensity of peaks was a reliable predictor of homoplasy. Then, *in silico* AFLPs were performed on three model species genomes covering wide taxonomical and genome size ranges, including a prokaryote (*Bacillus thuringiensis* ser. *konkukian*, 5.2 Mb), a plant (*Arabidopsis thaliana*, 120 Mb) and an animal genome (*Aedes aegypti*, 1,310 Mb). This made it possible to compare the profile quality (number of peaks generated and proportion of non-homologous co-migrating fragments per profile) in genomes which widely differ in size and in the abundance of repetitive sequences [36-38], but comparable for their GC content (35.4%, 36% and 38.2% respectively). We first examined the effect of genome features such as size and repeated elements prevalence and AFLP parameters (number of selective bases, GC content) on homoplasy at the intra-individual level (i.e. co-migrating fragments within a peak). We then looked at the effect of these parameters on the number of peaks generated and peak length distribution. As most AFLP studies are used on non-model species, we finally asked to what extent knowledge of the profiles obtained *in silico* for model species can help to predict the quality of the profiles obtained empirically on non-model related species. To answer this question, we compared the *in silico* AFLP results obtained in the three model species with the experimental AFLP profiles obtained in three related,

non-model species (*Bacillus thuringiensis* ser. *israelensis*, *Arabidopsis thaliana* and *Aedes triseriatus*).

Results

The ISIF procedure: description and validation on model species

The user friendly program ISIF allows carrying out *in silico* AFLPs on species for which whole genome sequences are available. ISIF is freely available at <http://www-leca.ujf-grenoble.fr/logiciels.htm>. The program can analyze all sequences saved as plain text, without line numbers and spaces, such as text files. The AFLP procedure is simulated by the program step by step: 1) identification of the restriction sites and production of the pool of restriction fragments, 2) selection of the final set of fragments that exhibit the selective bases used for the amplification, and 3) determination of the length of all peaks in the AFLP profile by adding the adaptor length to the selective AFLP fragments. For any restriction enzyme and selective bases combinations, ISIF can provide the sequences of the virtual fragments, their positions along the genome, their length and the length of the associated peaks in the AFLP profile.

In silico AFLPs on *A. thaliana* using the primer combination EcoRI+ATG/MseI+ATG generated 20 non-identical fragments between 50 and 500 pb; however, due to size homoplasy, this only corresponded to 13 different peak sizes (Figure 1). Experimental AFLP generated a profile with 12 peaks (Figure 1) and the two profiles almost perfectly matched, except for the expected peak at 410 bp that was scored as missing in the experimental profile (Figure 1) because it was below the detection threshold (only 85 rfu in intensity). We repeated the whole AFLP protocol three times, and we found no difference between the three experimental AFLP profiles; the reproducibility rate was 100%. All experimental sequenced fragments obtained by pyrosequencing perfectly matched the sequences of *in silico* fragments, including the 410 bp fragment.

In silico AFLP profiles

In silico analyses generated a total of 5,345 fragments and 2,709 peaks for the model species *B. thuringiensis* ser. *konkukian* (5 to 260 peaks per primer combination using 1 to 3 selective bases), 17,425 fragments and 9,907 peaks for *A. thaliana* (2 to 283 peaks per primer combination using 4 to 6 selective bases), and 21,729 fragments and 10,138 peaks for *Ae. aegypti* (3 to 294 peaks per primer combination using 5 to 8 selective bases). For each species, the mean number of peaks per group of primer combination with a similar number of selective bases (1 to 8 when considering the total number of selective bases added for the 2 primers) and nucleotide composition (GC content) is shown in Table 1. The results of all 284 primer

combinations are presented in Additional file 1. The total peak length distribution (i.e. without selective bases) showed that the number of small length peaks greatly exceeded that of longer length peaks for the three genomes (Figure 2A). Fragment length distribution did not differ between the eukaryote and prokaryote genomes (Table 2).

We first examined the effect of upstream parameters: genome features (size and repeated elements prevalence) and AFLP parameters (number of selective bases, GC content) on homoplasy. Homoplasy was measured using two statistics: the homoplasy rate (H) in each AFLP profile (i.e. ratio of the number of peaks containing co-migrating non-homologous fragments to the total number of peaks), and the number of co-migrating fragments per homoplasious peak. Then, we looked at the effect of these parameters on AFLP diagnostics (number of peaks and peak length distribution) to finally evaluate the accuracy of AFLP diagnostics to predict homoplasy.

Effects of upstream parameters on homoplasy

Homoplasy rate calculated for each primer combination ranged from 0 to 69.2% for *B. thuringiensis* ser. *konkukian*, 0 to 58.5% for the model species *A. thaliana* and 0 to 66.6% for *Ae. aegypti* (Figure 2B). There was no significant effect of genome size on homoplasy rate, but we observed significant differences of the number of co-migrating fragments within a peak among the three species with different genome size (Table 2). Homoplasious peaks contained on average 3 co-migrating fragments for the model species *B. thuringiensis* ser. *konkukian* (range: 2 - 18) and *A. thaliana* (range: 2 - 64) and 4 co-migrating fragments for *Ae. aegypti* (range: 2 - 582). The presence of repetitive elements had a positive effect on the number of co-migrating fragments. A large frequency of co-migrating fragments was found in *Ae. aegypti* peaks (Figure 2D).

In our study, a maximum of 582 co-migrating fragments in one single peak was observed for *Ae. aegypti*. Of the 582 co-migrating fragments of 324 bp, 580 exhibited high similarity in sequence (mean identity index = 0.97, range: 0.84 - 1, calculated with Bioedit version 7.0.5 [39]) and corresponded to highly repetitive sequences in the genome. Using RepeatMasker (<http://www.repeatmasker.org>, [40]), the sequence was identified as a LINE retroelement. For *A. thaliana*, a maximum of 64 co-migrating fragments of 108 bp including 61 similar sequences (mean identity index = 0.97, range: 0.87 - 1) was observed, corresponding to a LTR element (Gypsy). For *B. thuringiensis* ser. *konkukian*, two peaks contained 18 co-migrating fragments of 89 and 144 bp and were both composed of 14 fragments with the same sequence (mean Identity index = 1) but located at different places in the genome. These sequences were not identified as transposable elements by RepeatMasker.

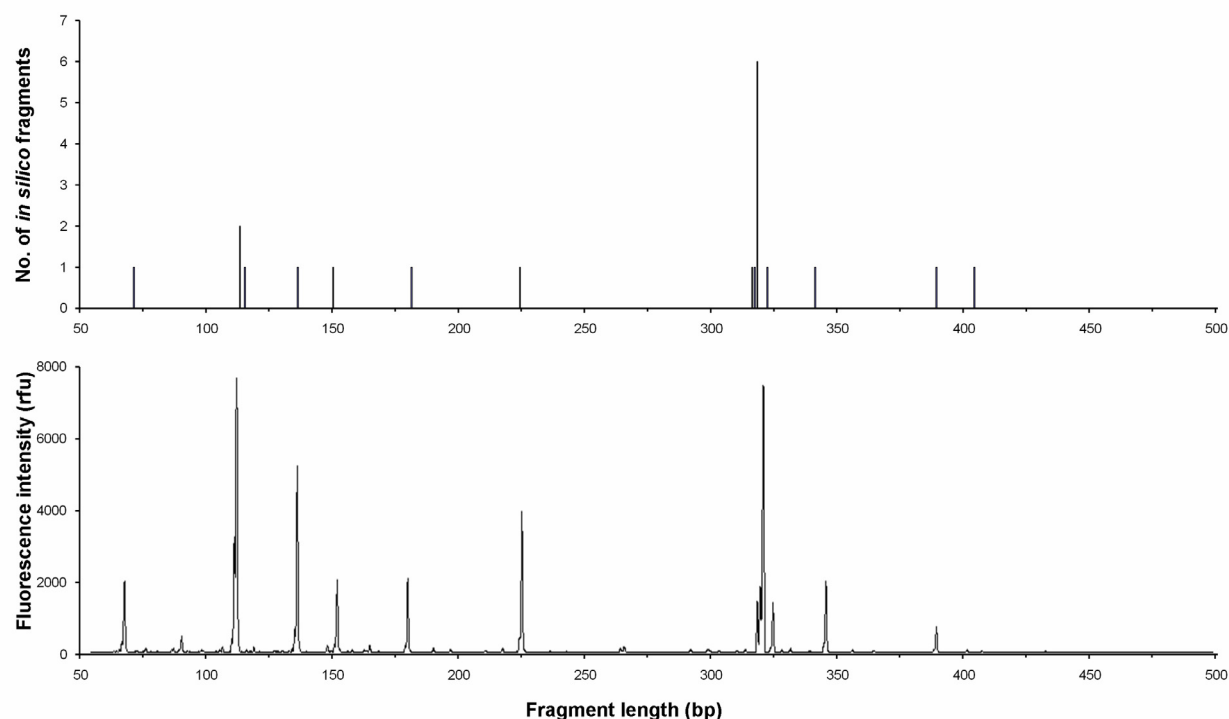


Figure 1 Comparison of the *in silico* (upper panel) and experimental (lower panel) AFLP profiles obtained with the primer combination EcoRI+ATG/MseI+ATG for the model species *Arabidopsis thaliana*.

Effects of upstream parameters on AFLP diagnostics

The number of selective bases determined the number of peaks generated and should be chosen according to the genome size under analysis; a larger number of selective bases reduced the number of fragments and peaks generated (Table 1). Furthermore, for the three species and for the same number of selective bases, the number of peaks generated decreased whilst the GC content of the selective bases increased (Table 2). For example, for *Ae. aegypti*, the primer combinations with 6 selective bases biased in AT produced more than twice the number of peaks than those biased in GC (mean = 156 and mean = 58 respectively, Table 1). The same trend was observed for the other species. The composition of primer combinations (i.e. GC content) had no significant effect on homoplasmy rate and on the number of co-migrating fragments present in the peaks (Table 2).

Accuracy of AFLP diagnostics to evaluate homoplasmy

Generalized linear model showed a very strong effect of the number of peaks in a profile on the homoplasmy rate (Table 2). Indeed, for all species a strong positive correlation was found between the number of peaks detected in a profile and the homoplasmy rate (Figure 2B, Pearson's correlation: $N = 84$, $r = 0.94$, $P < 0.001$ for *B. thurigiensis* ser. *konkukian*; $N = 100$, $r = 0.94$, $P < 0.001$ for *A. thaliana*

and $N = 100$, $r = 0.93$, $P < 0.001$ for *Ae. aegypti*). For example, in profiles with 100 peaks, about a quarter of peaks were composed of co-migrating fragments. The homoplasmy rate decreased to around 15% for profiles with 50 peaks. In our study, only 43 profiles out of 284 did not present any co-migrating fragments but they contained few peaks (2 - 32 peaks). However, the choice of primer combinations producing less than 30 peaks does not guarantee the absence or a low level of homoplasmy. For example, in the *A. thaliana*, the primer combination E+ACG/M+CTC generated a homoplasmy rate of 28.5% in a profile with 40 AFLP fragments distributed in only 7 peaks.

The probability of peaks being homoplasious was negatively correlated with their length, (Figure 2C; *B. thurigiensis* ser. *Konkukian*: Pearson's correlation, $r = -0.30$, $N = 329$, $P < 0.001$; *A. thaliana*: $r = -0.83$, $N = 451$, $P < 0.001$ and *Ae. Aegypti*: $r = -0.77$, $N = 451$, $P < 0.001$), small length peaks more often contained co-migrating fragments. For example, peaks smaller than 100 bp in length, accounted for 36% of the homoplasmy in our data. Our *in silico* results are in concordance with the theoretical finding that small peaks are more often homoplasious [18].

There was a significant positive effect of the total number of peaks in a profile on the number of co-migrating fragments present in peaks and a significant negative

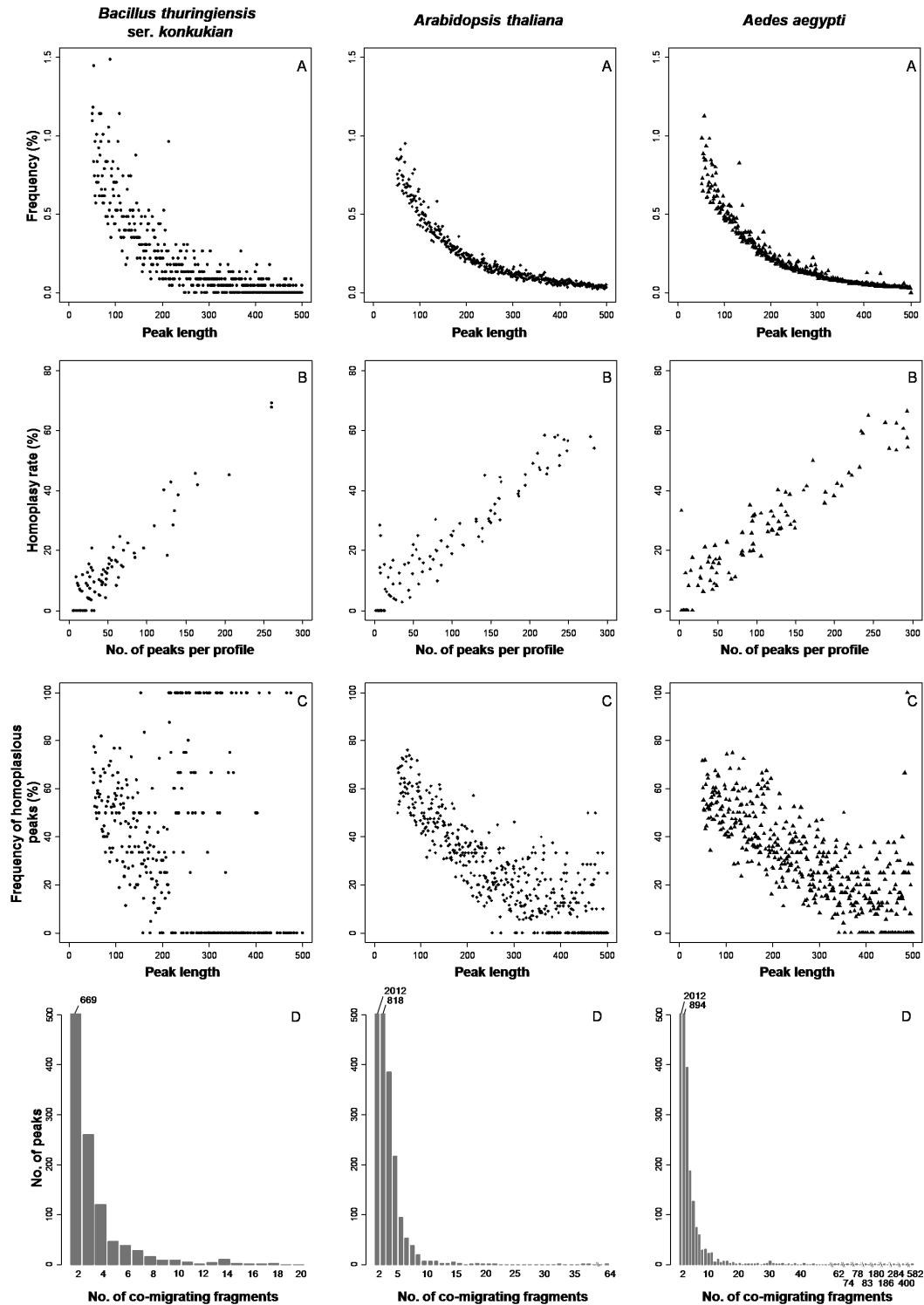


Figure 2 *In silico* AFLP results obtained using 84, 100 and 100 primer combinations for the species *Bacillus thuringiensis* ser. *konkukian*, *Arabidopsis thaliana* and *Aedes aegypti*, respectively. A) Length distribution of the number of AFLP peaks obtained between 50 and 500 bp. B) Relationship between the homoplasmy rate and the number of peaks per AFLP profile. C) Relationship between the frequency of homoplasious peaks and fragment length. D) Distribution of the number of co-migrating fragments in peaks (Y axis truncated at 80, real numbers indicated above each bar).

Table 1: Summary of the number of peaks per profile, homoplasmy rate and maximum number of co-migrating fragments obtained *in silico* with different numbers of selective bases for each species.

Species	Primer combinations			No. of peaks		Homoplasmy rate (%)		Max fragm ^c
	No. of sb ^a	GC cont ^b	No tested	Mean	Range	Mean	Range	
<i>Bacillus thuringiensis</i> ser. <i>Konkukian</i>	1	AT	2	260	260 - 260	68.5	67.7 - 69.2	18
	2	GC	2	184	162 - 206	45.4	45.2 - 45.7	18
		AT	4	140	122 - 165	37.2	28.4 - 41.8	16
		m	8	98	47 - 136	22.8	8.5 - 42.8	6
	3	GC	4	60	42 - 76	13.9	8.2 - 22.3	14
		AT	32	46	18 - 96	8.9	0 - 24.6	14
		GC	32	21	5 - 47	7.8	0 - 15.4	14
<i>Arabidopsis thaliana</i>	4	AT	27	207	139 - 283	46.6	27.3 - 58.5	64
	5	m	17	129	56 - 185	29.3	21.9 - 45.1	21
		GC	9	62	28 - 94	13.3	3.6 - 21.3	5
		AT	12	77	32 - 115	18.5	8.8 - 30.4	8
	6	GC	9	35	18 - 50	12.1	2.8 - 22	38
		AT	5	26	12 - 54	8.8	0 - 20.4	3
		m	11	12	4 - 21	4.3	0 - 15.4	3
<i>Aedes aegypti</i>	5	AT	6	266	232 - 294	58.4	47.8 - 66.6	61
		GC	8	253	209 - 293	53.2	41.6 - 62.4	582
	6	AT	17	156	94 - 234	36.7	27.5 - 59.8	400
		m	22	109	61 - 148	27.8	18.1 - 40.2	284
	7	GC	14	58	33 - 97	15.8	7 - 32	180
		AT	8	44	27 - 62	13.6	6.5 - 22.6	7
	8	GC	5	25	17 - 39	11.6	0 - 18	6
		AT	10	10	3 - 28	7.0	0 - 33.3	2
		m	5	8	5 - 12	1.7	0 - 8.3	3
		GC	5	6	3 - 11	6.7	0 - 33.3	2

^a Total number of selective bases added for the 2 primers.

^b "GC cont" is composed of three classes of selective bases differing according to the proportion of their GC content: "AT" corresponds to selective bases containing a larger number of A or T, "GC" to selective bases containing a larger number of C or G, "m" to selective bases containing same number of A or T and C or G.

^c Maximum number of co-migrating fragments in one single peak.

Table 2: Summary of generalized linear model results. Each row corresponds to a single model using multiple explanatory variables. Significant values are indicated in bold. Quasibinomial and negative-binomial error distributions were used and results are given after calculating type-II analysis-of-variance using a *F* test (Quasibinomial family) or a likelihood ratio test (negative-binomial family).

Response variables		Explanatory variables						
		Upstream parameters	AFLP parameters		AFLP diagnostics			
			Species	No. of sba	CG cont	No. of peaks per profile	Peak length	Homoplasmy per peak
			(Df = 2)	(Df = 1)	(Df = 2)	(Df = 1)	(Df = 1)	(Df = 1)
In silico analyses								
Peak length distribution ^b	Quasibinomial	$F_{1,1349} = 2.09\text{e-}12$, $P = 1$				$F_{1,1349} = 967.20$, $P < 0.001$		
No. of peaks per profile	Negative binomial	$\chi^2 = 1574.87$, $P < 0.001$	$\chi^2 = 1869.47$, $P < 0.001$	$\chi^2 = 275.24$, $P < 0.001$				
Homoplasmy rate H	Quasibinomial	$F_{2,278} = 0.98$, $P = 0.38$		$F_{2,278} = 0.72$, $P = 0.49$	$F_{1,278} = 576.26$, $P < 0.001$			
No. of CF ^c	Negative binomial	$\chi^2 = 19.90$, $P < 0.001$		$\chi^2 = 2.99$, $P = 0.22$	$\chi^2 = 25.32$, $P < 0.001$	$\chi^2 = 37.92$, $P < 0.001$		
No. of CF ^c in peaks with more than 10 fragments	Negative binomial	$\chi^2 = 6.96$, $P = 0.03$		$\chi^2 = 0.90$, $P = 0.64$	$\chi^2 = 0.87$, $P = 0.35$	$\chi^2 = 2.74$, $P = 0.10$		
Empirical analyses								
Fluorescence intensity	Negative binomial					$\chi^2 = 22.33$, $P < 0.001$	$\chi^2 = 2.39$, $P = 0.12$	

^a Total number of selective bases added for the 2 primers.

^b Peak length distribution is expressed in relative frequencies.

^c "CF" corresponds to comigrating fragments within a peak.

effect of peak length (Table 2). Indeed, homoplasious peaks contained more co-migrating fragments in profiles with a large number of peaks and in a smaller length range. However, when considering only peaks containing more than 10 co-migrating fragments (183 peaks), no more effect of peak size or effect of the number of peaks in a profile on the number of co-migrating fragments were detected (Table 2). This suggests a random size distribution of peaks containing a large number of fragments.

Detecting homoplasious peaks in empirical profiles

A total of 118 peaks were generated by the seven primer combinations on the model species *Arabidopsis thaliana*, of which 10 were homoplasious. There was a significant effect of peak size on peak fluorescence intensity and no significant effect of homoplasmy (Table 2). Homoplasious peaks tended to exhibit higher fluorescence intensity than non-homoplasious peaks (means \pm sd: 6803 \pm 3632

rfu and 4198 \pm 3303 rfu respectively), but many non-homoplasious peaks also exhibited high fluorescence, so that peak intensity may not represent a valuable quality criterion in detecting homoplasious peaks.

Predicting the AFLP profiles of non-model species

The number of fragments obtained *in silico* for three model species, the bacterium *B. thuringiensis* ser. *konkukian*, the plant *A. thaliana* and the insect *Ae. aegypti*, was compared with that obtained for closely related species, *B. thuringiensis* ser. *israelensis*, *Arabidopsis alpina* and *Aedes rusticus*, for which no full genome sequences were available (Figure 3A). The details for each model/non-model species pair and each primer combination are presented in Additional file 2.

For all species pairs, we found a positive, significant relationship between the number of *in silico* fragments and the average number of experimental fragments (Pearson's correlation: N = 6, r = 0.96, P = 0.003 for bacteria; N

= 19, $r = 0.86$, $P < 0.001$ for plants and $N = 20$, $r = 0.86$, $P < 0.001$ for mosquitoes). The number of fragments in *A. alpina* tended to be larger than the number of *in silico* fragments of *A. thaliana*. This difference was not surprising since the *A. alpina* genome ($2n = 16$) is larger than the *A. thaliana* genome ($2n = 10$, [41]). For *Bacillus* and *Aedes*, the relationship between model and non-model species was close to a linear function with slope 1 and intercept 0 for profiles with less than 150 peaks (Figure 3A). However *in silico* AFLP tended to over-estimate the number of peaks in non-model species for primer combinations generating more than 150 peaks per profile (Figure 3A).

The distribution of peak length differed for all model/non-model species pairs. For all non-model species, small peaks (less than 70-100 bp depending on species) were significantly below the number expected *in silico* in model species (Figure 3B). For mosquitoes and plants, large peaks (more than 300 bp) were also overestimated *in silico*. This pattern was not present in *Bacillus*, probably because only few peaks are predicted in this range.

Discussion

Lessons of *in silico* AFLPs to detect homoplasia

The ISIF program allows to accurately predict AFLP profiles in model species using the genomic information available. The correspondence between *in silico* and empirical AFLP profiles has already been described for simple model species of bacteria [42,43] and for the plant *A. thaliana* [34].

The experimental AFLP procedure generated the peaks predicted by the *in silico* analysis carried out using ISIF, except for one long fragment (> 400 bp) insufficiently amplified to be detectable on the electrophoresis profile. However, this fragment was detected by pyrosequencing. The decrease in AFLP peak intensity as peak length increases is a well known phenomenon [28,44] illustrated here (see Figure 1). In our profile, fluorescence showed a decreasing intensity in high fragment lengths, except for the 318 bp peak containing 6 co-migrating fragments which exhibited much higher fluorescence intensity than the peaks of similar length. This suggests that fluorescence intensity could be a good indicator for peaks containing many different co-migrating fragments. However,

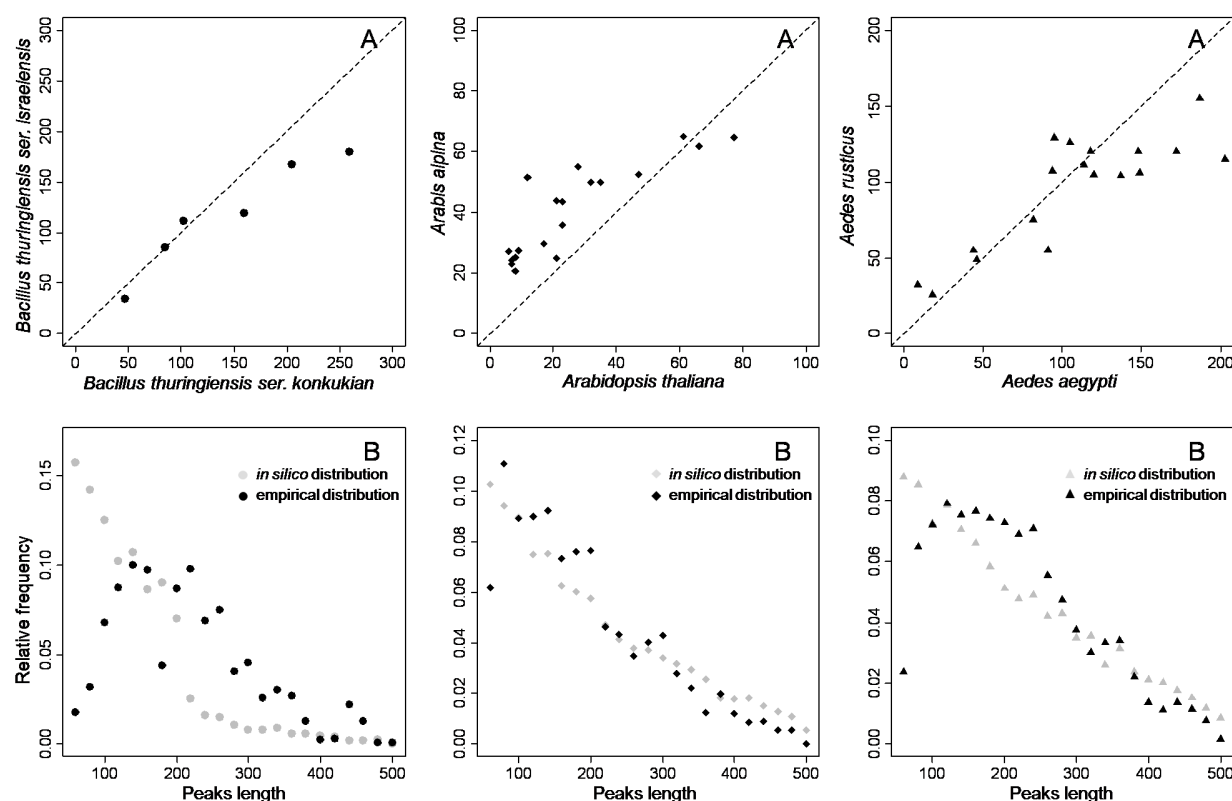


Figure 3 *In silico* AFLPs obtained on model species vs. empirical AFLPs obtained on related non-model species. A) Comparison between numbers of peaks per profile obtained for model and non-model species. B) AFLP peak length distribution obtained *in silico* and empirically. Peaks were grouped by classes of 20 bp-length. Symbols ● corresponded to bacteria species, ◆ to plant species and ▲ to insect species.

detecting homoplasious peaks in an experimental AFLP profile based on fluorescence intensity remains a challenge, because the intensity of a peak does not necessarily reflect the actual number of different co-migrating fragments. For example, in the profile shown in Figure 1, the 113 bp peak contains two co-migrating fragments, but is less intense than the 115 bp peak which is not homoplasious. Overall, in *A. thaliana*, the effect of homoplasia on peak fluorescence intensity was not significant (Table 2). This limitation in detecting *a posteriori* homoplasious peaks in an experimental profile highlights the need to develop tools to limit *a priori* the probability of generating homoplasious peaks. *In silico* AFLPs make it possible to choose the best primer combinations prior to carrying out the experimental procedure.

Homoplasia in model species

A high level of homoplasia was found when analyzing all study species, ranging up to 69%. For all species, homoplasia was highly dependent on the number of peaks generated per profile. It was about 15% in profiles containing 50 peaks and as much as 25% in profiles containing 100 peaks. This is in the range of homoplasia theoretically predicted by modeling the distribution of fragment lengths and calculating homoplasia rates given the fragment number in a profile [25], or experimentally estimated in sugar beet (13%) [24]. Given that the aim of most AFLP studies is to generate a large number of polymorphic markers at the lowest cost, many AFLP based studies are likely to contain a large number of homoplasious peaks.

For a given number of selective bases, the number of peaks per profile depends on genome size. To obtain a 50-peaks profile, a total of 3 selective bases are needed for *B. thuringiensis* var *konkukian*, 5 - 6 for *A. thaliana*, and 6 - 7 for *Ae. aegypti*. Accordingly, Althoff et al. [13] obtained 0 to 189 peaks per profile when carrying out *in silico* AFLP with 6 selective bases primer combinations of 8 taxa with genome size ranging from 5.23 to 2900 Mb. In their study, homoplasia ranged from 0% for bacteria with profiles containing 0 or 1 peak to 49% for a human profile containing 171 peaks. The authors concluded that homoplasia is dependant on genome size. However, by using the same primer combinations for all species, they could not distinguish between the linked effects of genome size and of the number of peaks per profile. In our study, a large range of primer combinations adapted for each species was used to obtain profiles containing at least 5 to 260 peaks per species, allowing for discrimination between the effects of genome size and the number of peaks. For a given number of peaks per profile, the homoplasia rate (i.e. the proportion of peaks containing co-migrating fragments) was apparently not related to genome size or systematic position.

However, homoplasious peaks can contain a larger number of co-migrating fragments in large and complex genomes. Furthermore, even if small length peaks are more likely to be homoplasious than longer peaks as previously reported [12], our results suggest that this can be not valid for peaks containing more than 10 fragments, as we observed highly homoplasious peaks at almost any length. The most frequent type of homoplasious peak is made up of two or more fragments of different sequences, co-migrating by chance. Small peaks are more likely to belong to this type, because of the skewed fragment length distribution (Figure 2A). Less frequently, homoplasious peaks are made up of many highly repetitive sequences. This is more likely to be found in large genomes, as they usually contain many repetitive sequences, such as transposable elements [37,45]. For example, an impressive 582 co-migrating, highly similar fragments was found in *Ae. aegypti*. This is not completely unexpected as 47% of the *Ae. aegypti* genome consists of transposable elements which can exhibit up to 50,000 copies per genome [38,46]. A strategy that could be used to avoid cutting in transposable elements is to use restriction enzymes sensitive to DNA methylation, because many transposable elements are known to be silenced by methylation [47]. However, this strategy cannot be routinely recommended to AFLP users, because transposable elements silencing is not only species dependent, but also tissue-dependent.

All these results highlight the importance of the choice of primer combination for the quality and the practical usefulness of the AFLP profiles. Both the number and the GC content of selective bases can have a strong effect on the number of peaks per profile, and therefore on homoplasia. In our case, the three genomes analyzed are AT-rich, so that primers with AT selective bases generate more peaks and therefore more homoplasious profiles. Furthermore, some combinations generate a particularly high homoplasia rate, or amplify repeated sequences.

Predicting the AFLP profiles of non-model species

The *in silico* AFLP profile obtained from the model species can help to predict the AFLP profiles obtained in related species, for which complete genomic information does not exist. For the three pairs of species analysed, we observed a strong correlation between the predicted and observed profiles. The correlation was particularly strong between two varieties of the same species, *Bacillus thuringiensis* ser. *konkukian* and var *israelensis*, but remained very strong between species of the same genus (*Aedes*) and even between two species from different genera (*Arabidopsis* and *Arabis*) and with different genome sizes (two-fold difference [41]). In model species, the homoplasia rate is strongly correlated to the profile quality (number and size distribution of peaks generated). As

non-model species profile quality is correlated to that obtained in model species, the extent of homoplasy in non-model species can be predicted from their profile quality.

In silico AFLPs tended to over-estimate the number of peaks expected in non-model species for profiles with more than 150 peaks. This phenomenon has already been described in the tetraploid species *Damasonium alisma* that produced less AFLP peaks using a primer combination with 6 selective bases than using a primer combination with the same 6 selective bases plus an additional A, T, G or C [29]. For the authors, many of the loci were insufficiently amplified using the 6 selective bases primer combination to produce peaks higher than the scoring threshold and were therefore not scored. Indeed, the decrease in the number of AFLP peaks scored in profiles with a large number of peaks may be due to multiple causes, including scoring errors in complex profiles [48,49], competition across fragments during the amplification process [29], and the poor amplification of longer fragments [28,44]. According to this later hypothesis, we observed less large fragments (more than 300 bp) than expected in all our *in silico*/experimental comparisons, except for the *Bacillus* pair of species for which few large fragments were expected. Furthermore, less small fragments than expected were observed in all our *in silico*/experimental comparisons. This could be due to the loss of small fragments during the purification step before separation, although the purification protocol we used is supposed to retain fragments larger than 30 bp; or they could be lost during the electrophoresis separation.

Finally, the quality of sequences in published model species genomes could be a further source of bias in the number of peaks predicted with *in silico* AFLP. Indeed, most available model genomes contain genotyping errors or gaps represented by a series of Ns, even for the model species *A. thaliana*. Finally, the fragmentation of most large published genomes into thousands of scaffolds (for example, the *Ae. aegypti* genome is composed of 4,768 supercontigs) may further bias the estimation of the number of fragments amplified.

Recommendations

The optimization of the AFLP reaction (and especially the choice of selective primers) is often achieved through an empirical procedure. For instance, the polymorphism and the reproducibility of markers are generally the most important criteria on which the choice of AFLP primers is based. However, such optimization procedures are probably not able to avoid, in a reliable way, the occurrence of size homoplasy in AFLP profiles. Here we show that ISIF allows a rapid screen of candidate restriction enzymes and/or combinations of selective bases during the optimization steps of the AFLP reaction. Low level of homoplasy at the intra-individual level is likely to coin-

cide with low level of homoplasy at the inter-individual level. *In silico* AFLPs can be used to prevent homoplasy in AFLP data sets and in turn, reduce biases in population genetics, conservation of genetic resources or genome scan analyses. In addition, the present study shows that genomic sequences of model species can be used to predict AFLP profiles generated in related non-model species. Finally, ISIF represents a key tool to plan the number of fragments to be sequenced in complex and costly high throughput genomic experiments such as pyrosequencing, or to address further questions such as evaluating the distribution of restriction fragments in genomes. We conclude the present study with general suggestions on the choice of primer combinations and the process for peak selection. These suggestions in addition to recommendations made in Gort et al. [18] will help to improve experimental AFLP studies on both model and non-model species.

- Primer combinations generating less than 30 AFLP peaks per profile can help to limit homoplasy within a profile. In practice, the total number of six selective bases originally recommended by Vos et al. [5], generally used in most published studies, is insufficient in preventing homoplasy in most plant and animal genomes. In addition, the choice of selective bases biased in GC content can reduce markedly the number of peaks generated for many species. Furthermore, the choice of restriction enzymes with high GC content recognition sites is likely to reduce the number of restriction fragments for low GC content genomes.
- If possible, primer combinations which amplify repetitive sequences should be avoided.
- Peaks smaller than 100 bp in length can pose problems, as they can be responsible of more than one third of homoplasy. Our analysis suggests that focusing on the longer fragments would help reduce this issue.
- Peaks of large length that exhibit particularly high fluorescence intensity compared to peaks of a similar length in the same profile should be considered with caution, as they often contain several non-homologous co-migrating fragments.
- The mean number of peaks per profile should always be mentioned in AFLP studies to allow the evaluation of the homoplasy rate within profiles. Indeed, most of the published studies only mention the total number of polymorphic peaks scored (but see Meyer et al. [50]). However, this does not correspond to the number of peaks per profile, which depends on the relatedness across individuals and on the number of individuals genotyped. For example, the analysis of a small number of individuals, of related individuals or of poorly differentiated populations can lead to the identification of only a small total

number of polymorphic fragments, but with a large number of fragments per profile.

Conclusions

Carrying out *in silico* analyses before the experimental work allows a rapid screen of candidate restriction enzymes and the combinations of selective bases to be used, in order to optimize the experimental work. It can also help to plan the number of fragments to be sequenced in complex and costly high throughput genomic experiments such as pyrosequencing. Most importantly, *in silico* AFLP can help to limit homoplasy in AFLP data sets, reducing biases in population genetics, conservation of genetic resources or genome scan analyses. Finally, *in silico* analysis represents a key tool to address further questions such as evaluating the distribution of restriction fragments in genomes.

Methods

In silico AFLPs on model species

Three model species for which the full genome sequences are available were used in this study: *Bacillus thuringiensis* ser. *konkukian*, *Arabidopsis thaliana* (ecotype Columbia) and *Aedes aegypti* (Liverpool strain). *Bacillus thuringiensis* ser. *konkukian* genome and plasmid were obtained from GenBank (accession number [AE017355](#) and [CP000047](#)), *Arabidopsis thaliana* genome was obtained from The Arabidopsis Information Resource <http://www.arabidopsis.org>, and *Aedes aegypti* genome was obtained from VectorBase <http://www.vectorbase.org>. *In silico* AFLPs were performed on total genomic DNA for *A. thaliana* and *Ae. aegypti* without taking into account organellar genomes that are negligible in length in comparison to the nuclear genome [13]. For bacteria the length of the plasmidic genome is of significant length in the whole genome, therefore both genomic DNA and plasmid DNA were used for *B. thuringiensis* ser. *konkukian*. For all *in silico* analyses, fragments between 50 and 500 pb were considered.

For *B. thuringiensis* ser. *Konkukian*, *in silico* AFLP profiles were generated using all possible combinations of primers EcoRI/MseI: E+0/M+1, E+1/M+1 and E+1/M+2 (84 combinations). For the species *A. thaliana* and *Ae. aegypti*, 100 EcoRI/MseI primer combinations were randomly chosen among combinations containing between 3 to 5 selective bases and 5 to 8 selective bases respectively (Additional file 1). For each species, the number and the sequence of the selective bases used for amplification were chosen in order to generate less than 300 peaks per profile. Producing profiles with more than 200 peaks is unrealistic in practice but such situations were chosen here to ensure a high homoplasy rate. For each *in silico* profile, the number of non-identical fragments (i.e. fragments with different sequences or chromosomal positions) and the number of detectable peaks (i.e.

regrouping all co-migrating fragments) were determined. All statistical analyses were carried out using R software version 2.5 [51].

We tested the effects of the number of peaks in profiles and of species identity on H in a generalized linear model (GLM) with a Quasibinomial error. Subsequently, for each species we performed Pearson's correlation between H and the number of peaks per profile, and between H and peak length. The effects of the number of peaks in profiles, peak length, species identity and composition of selective bases (i.e. GC content) on the number of co-migrating fragments in homoplasious peaks were tested in a GLM; models with Poisson error distribution showed evidence of overdispersion, therefore we used a negative binomial family to build models [52]. The effects of these four parameters on the number of co-migrating fragments in homoplasious peaks were then tested in a GLM including only peaks containing more than 10 co-migrating fragments. For GLMs, significance was calculated using type-II analysis-of-variance using a *F* test (quasibinomial models) or a likelihood ratio test (negative-binomial models) [52].

Empirical AFLP profiles in a model species

The genome of the model species *Arabidopsis thaliana* was used to validate the reliability of both experimental AFLP and of the results of ISIF *in silico* AFLP. The advantage of using this selfing plant is that the published genome (Ecotype Columbia) is identical to the genome of all plants from this ecotype. An *in silico* profile using the primer combination EcoRI+ATG/MseI+ATG was generated and compared with the corresponding experimental AFLP profile. This primer combination was chosen because *in silico* it generated two homoplasious peaks (containing 2 and 6 co-migrating fragments, respectively). AFLP analyses were obtained according to Paris et al. [53]. In short, 150 ng of the total genomic DNA was first digested with 2 units of EcoRI (New England Biolabs) for 2.5 hours at 37°C, and then with 5 units of MseI (New England Biolabs) in the same conditions. Specific oligonucleotide adaptors were then ligated to the end of the restriction fragments with 1 unit of T4 DNA ligase (New England Biolabs) for 3 hours at 37°C. Pre-selective and selective amplifications were performed with 0.2 µM of primers complementary to the adaptor sequences after 20 times dilution of the digestion/ligation product and 10 times dilution of the pre-selective PCR product. Labeled selective fragments were separated by electrophoresis on an ABI 3130 capillary sequencer (Applied Biosystems). AFLP patterns were then visualized with GeneMapper V3.7 software (Applied Biosystems): a fluorescent peak corresponds to the presence of an amplified restriction fragment. A scoring threshold of 500 rfu in fluorescence intensity was set up to detect peaks. For each sample, all peaks between 50 and 500 pb were considered. Repro-

II- Scan génomique avec des marqueurs DArT liés à un élément transposable

II.1- Présentation de l'étude et principaux résultats

Les **éléments transposables** représentent une des composantes majeures des génomes, et près de 50% du génome du moustique *Aedes aegypti* (Nene et al. 2007). Affectant la régulation de l'expression des gènes ou leur fonctionnalité, les éléments transposables jouent un rôle important en évolution. Présents en de très nombreuses copies et possédant des taux de mutation très élevé par rapport au reste du génome, les éléments transposables sont souvent impliqués dans des changements adaptatifs rapides (Aminetzach et al. 2005, Yang et al 2007). Par exemple, l'insertion d'un rétrotransposon dans le gène codant pour le récepteur membranaire de l'insecticide bactériologique *Bacillus sphaericus* est responsable de la résistance à cet insecticide chez le moustique *Culex pipiens* (Darboux et al. 2007). Cette insertion crée un nouvel intron dans le gène hôte qui produit alors un récepteur tronqué, incapable de fixer la toxine produite par *Bacillus sphaericus*.

Les « miniature inverted-repeat transposable elements » (MITEs) sont des éléments qui se transposent en utilisant un mécanisme de « couper-coller » par excision puis réinsertion à un autre locus dans le génome (Wessler et al. 1995, Feschotte et al. 2002). Ils sont de petite taille (> à 500 pb), et ont la particularité de s'insérer préférentiellement dans les régions codantes (Bureau and Wessler 1992; Zhang et al. 2000; Jiang and Wessler 2001). Ils sont donc de bons marqueurs moléculaires pour les études de diversité génétique et de génomique adaptative (Lyons et al. 2008). Représentée par plus de 6000 copies dans le génome d'*Ae. aegypti* (Nene et al. 2002) et possédant des séquences relativement conservées, la sous-famille *Pony* a été choisie pour l'étude de la résistance au *Bti* chez la souche LiTOX.

La diversité génétique liée aux éléments *Pony* a été étudiée grâce à la **technologie DArT** « Diversity Arrays Technology » qui permet d'obtenir plusieurs milliers de marqueurs liés d'une part à l'élément transposable et d'autre part à un site de restriction. Cette technologie décrite plus en détail en introduction de cette thèse, a été développée par un laboratoire australien pour l'étude du riz (Jaccoud et al. 2001) et est particulièrement utilisée depuis pour l'étude de plantes cultivées (Jaccoud et al. 2001, Wenzl et al. 2004, Akbari et al.

2006). Cependant cette approche n'avait jamais été appliquée sur d'autres organismes comme les animaux. Le développement de cette technique chez le moustique *Ae. aegypti* a été effectué avec succès par Aurélie Bonin, lors d'un post doctorat en Australie. Plus de 6000 marqueurs ont été obtenus avec cette technologie, dont 476 marqueurs polymorphes, sur une soixantaine d'individus appartenant aux souches sensible et LiTOX, (article 4 : Bonin et al. 2008).

Dans ce contexte, mon travail de thèse a consisté à 1/ rechercher les marqueurs les plus différenciés entre les deux populations, 2/ les séquencer, 3/ les positionner sur le génome d'*Ae. aegypti* et 4/ identifier les gènes candidats à proximité. J'ai également participé au séquençage de 2 de ces gènes candidats (une aminopeptidase et une cadhérine), l'analyse des séquences ayant été effectuée principalement par Guillaume Tetreau lors de son stage de Master 2.

La différenciation génétique entre les deux souches de moustique (Bora-Bora et LiTOX) obtenue avec les 476 marqueurs DArT est particulièrement élevée : $F_{ST} = 0.556$. Cette **forte différenciation** n'a pas permis l'utilisation des méthodes classiques de détection des *outliers*. En effet, ces méthodes sont basées sur la comparaison de la distribution des F_{ST} des marqueurs avec une distribution neutre simulée à partir du F_{ST} moyen entre les populations. Pour un F_{ST} moyen aussi élevé, l'intervalle de confiance à 95% de la distribution neutre simulée est très large et peu de marqueurs peuvent être détectés comme *outliers*. Nous avons donc décidé de choisir les 70 marqueurs différenciant au maximum les deux populations : c'est-à-dire ceux qui étaient fixés dans une des populations et absents dans l'autre, à plus ou moins un individu. Pour des raisons pratiques, ces marqueurs seront tout de même nommés '*outliers*'. Grâce à l'**étape de clonage de la technique DArT**, des séquences entre 18 et 998 pb ont pu être aisément obtenues pour les 70 marqueurs *outliers* DArT. Ces séquences sont composées de l'élément transposable PONY d'environ 150 pb puis, d'une séquence plus ou moins longue correspondant au locus dans lequel l'élément PONY s'est transposé. Les 150 pb correspondant à l'élément transposable ont été retirés des séquences avant de les utiliser pour les alignements (Blast) sur le génome d'*Ae. aegypti* disponible en ligne (Vectorbase.org).

Sur 70 loci *outliers* détectés et séquencés, 42 répartis sur 40 supercontigs ont pu être localisés de façon précise sur le génome d'*Ae. aegypti*, les autres séquences correspondant à

des séquences répétées (article 5 : Bonin et al. 2009). Une fois encore, la détection d'un nombre élevé de régions du génome potentiellement sous sélection semble confirmer le caractère multigénique de la résistance au *Bti*. Six gènes candidats ont été identifiés sur les mêmes supercontigs que ces 42 loci *outliers*. Parmi eux, **deux apparaissent de bons candidats à la résistance au *Bti*** : une cadhérine avec deux *outliers* à proximité, et une aminopeptidase.

Le niveau de transcription de ces deux gènes a été comparé entre la souche sensible et la souche LiTOX par RT-PCR quantitative en temps réel (appareil IQS, Biorad). Seul le gène codant pour la cadhérine montre **une réduction significative de deux fois de son niveau de transcription**. Une réduction du nombre de récepteurs peut entraîner une augmentation de la résistance aux toxines de *Bacillus thuringiensis* (Griffitts et al. 2005, Barrows et al. 2006), et une baisse de deux fois de ce récepteur potentiel peut « contribuer » à la résistance observée chez la souche sélectionnée. Cependant cette diminution, n'est probablement pas responsable à elle seule des taux de résistance de plus de 30 fois observés chez la souche sélectionnée LiTOX.

De manière à rechercher la présence éventuelle de mutations dans ces gènes, ils ont ensuite été séquencés chez 11 et 12 individus de la souche sensible et LiTOX respectivement. Bien que la fréquence des haplotypes de ces gènes diffère entre les deux souches, **aucune mutation diagnostique** permettant de discriminer les deux souches de moustique n'a été identifiée. Comme attendu, la souche LiTOX présente une baisse de diversité haplotypique et nucléotidique pour les 2 gènes étudiés. Cela peut refléter une sélection directionnelle, mais aussi s'expliquer simplement par des effectifs plus faibles au cours de l'histoire de la sélection (dérive génétique). En effet, la souche LiTOX a subi un fort goulot d'étranglement à la dixième génération de sélection avec seulement 25 individus reproducteurs. Nous connaissons parfaitement **l'histoire démographique de la souche LiTOX** (tableau n°1), aussi avons-nous simulé par coalescence la diversité nucléotidique attendue étant donné l'histoire démographique de la souche LiTOX (logiciel ms, Hudson 2002), et nous l'avons comparé à la diversité observée. Les tests de neutralité prenant en compte l'histoire démographique de la souche LiTOX mettent en évidence une signature de sélection directionnelle significative dans le gène codant pour la cadhérine, alors que la baisse de diversité observée dans la

séquence de l'aminopeptidase de la souche LiTOX ne permet pas de rejeter l'hypothèse de neutralité pour ce gène.

Les **signatures de sélection détectées dans le gène codant pour la cadhérine** semblent confirmer son lien potentiel avec la résistance aux toxines du *Bti* chez la souche LiTOX. L'absence de mutation diagnostique dans ce gène entre les deux souches n'est pas étonnante car après seulement 18 générations de sélection, il est peu probable d'avoir fixé les mutations de résistance lorsque celle-ci est multigénique. Cependant, il est délicat d'attribuer de façon certaine la signature de sélection observée à une sélection opérant sur ce gène, car la sélection peut s'effectuer sur un autre gène à proximité (par effet « autostop »). Par exemple, 44 autres gènes sont annotés dans le supercontig contenant cette cadhérine, dont environ un tiers de fonction inconnue. Des analyses plus poussées sur ce gène sont donc nécessaires pour confirmer son implication dans la résistance aux toxines du *Bti* : séquençage plus important de ce gène et des régions adjacentes, inhibition de son expression par ARN interférant ou analyse du potentiel de fixation de cette cadhérine avec les toxines.

II.2- Contribution sous forme d'articles

Article 4 : BONIN A, PARIS M, DESPRES L, TETREAU G, DAVID JP, KILIAN A (2008). A MITE-based genotyping method to reveal hundreds of DNA polymorphisms in an animal organism after a few generations of artificial selection. *BMC Genomics*, 9:459.

Article 5 : BONIN A, PARIS M, TETREAU G, DAVID JP, DESPRES L (2009). Candidate genes revealed by a genome scan for mosquito resistance to a bacterial insecticide: sequence and gene expression variation. *BMC Genomics*, 10:551.

Chapitre 3 - Article 4

A MITE-based genotyping method to reveal hundreds of DNA polymorphisms in an animal organism after a few generations of artificial selection.

BONIN A, PARIS M, TETREAU G, DESPRES L, DAVID JP, KILIAN A

BMC Genomics (2008) 9:459.

Methodology article

Open Access

A MITE-based genotyping method to reveal hundreds of DNA polymorphisms in an animal genome after a few generations of artificial selection

Aurélie Bonin^{*1,2}, Margot Paris¹, Laurence Després¹, Guillaume Tetreau¹, Jean-Philippe David¹ and Andrzej Kilian²

Address: ¹Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS-UMR 5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble cedex 09, France and ²Diversity Arrays Technology P/L, PO Box 7141, Yarralumla, ACT 2600, Australia

Email: Aurélie Bonin^{*} - abonin@indiana.edu; Margot Paris - margot.paris@e.ujf-grenoble.fr; Laurence Després - laurence.despres@ujf-grenoble.fr; Guillaume Tetreau - guillaume.tetreau@e.ujf-grenoble.fr; Jean-Philippe David - jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr; Andrzej Kilian - a.kilian@diversityarrays.com

^{*} Corresponding author

Published: 6 October 2008

Received: 25 July 2008

BMC Genomics 2008, 9:459 doi:10.1186/1471-2164-9-459

Accepted: 6 October 2008

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/9/459>

© 2008 Bonin et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: For most organisms, developing hundreds of genetic markers spanning the whole genome still requires excessive if not unrealistic efforts. In this context, there is an obvious need for methodologies allowing the low-cost, fast and high-throughput genotyping of virtually any species, such as the Diversity Arrays Technology (DArT). One of the crucial steps of the DArT technique is the genome complexity reduction, which allows obtaining a genomic representation characteristic of the studied DNA sample and necessary for subsequent genotyping. In this article, using the mosquito *Aedes aegypti* as a study model, we describe a new genome complexity reduction method taking advantage of the abundance of miniature inverted repeat transposable elements (MITEs) in the genome of this species.

Results: *Ae. aegypti* genomic representations were produced following a two-step procedure: (1) restriction digestion of the genomic DNA and simultaneous ligation of a specific adaptor to compatible ends, and (2) amplification of restriction fragments containing a particular MITE element called *Pony* using two primers, one annealing to the adaptor sequence and one annealing to a conserved sequence motif of the *Pony* element. Using this protocol, we constructed a library comprising more than 6,000 DArT clones, of which at least 5.70% were highly reliable polymorphic markers for two closely related mosquito strains separated by only a few generations of artificial selection. Within this dataset, linkage disequilibrium was low, and marker redundancy was evaluated at 2.86% only. Most of the detected genetic variability was observed between the two studied mosquito strains, but individuals of the same strain could still be clearly distinguished.

Conclusion: The new complexity reduction method was particularly efficient to reveal genetic polymorphisms in *Ae. aegypti*. Overall, our results testify of the flexibility of the DArT genotyping technique and open new prospects as regards its application to a wider range of species, including animals which have been refractory to it so far. DArT has also a role to play in the current burst of whole-genome scans carried out in various organisms, which track signatures of selection in order to unravel the basis of genetic adaptation.

Background

Since the early sixties and the first protein gels to assess genetic diversity in human and *Drosophila*, genotyping methods have gone a very long way. Researchers working on model organisms have now at their disposal a repertoire of different molecular markers to help answer various biological questions [1]. For such species, the recent advances in genotyping throughputs and data management allow to simultaneously examine many loci in the genome of many individuals, leading the way to the genomic era [2]. However, as regards non-model species, the picture is not so bright. For most organisms indeed, whole genome surveys are often hampered by a shortage of genomic sequences and/or a lack of interspecific transferability of known molecular markers such as microsatellites or single nucleotide polymorphisms (SNPs) [3,4]. In this context, there is an obvious need for new methodologies allowing the low-cost, fast and high-throughput genotyping of virtually any species.

The Diversity Arrays Technology (DArT) has the potential to fill in this gap [5]. This innovative genotyping method can provide from hundreds to tens of thousands of highly reliable markers for any species in theory, as it does not require any precise information about the genome sequence [5,6]. Moreover, DArT was recently shown to provide good genome coverage in wheat and barley [6,7]. The keystone of the DArT protocol is a step called "genome complexity reduction". This step aims at providing a genomic representation of the studied DNA sample, by extracting informative loci while avoiding repetitive sequences that usually plague eukaryote genomes. This is generally achieved by methylation sensitive restriction enzyme digestion, adaptor ligation and subsequent PCR amplification [6]. The number of markers DArT detects is determined primarily by the level of DNA sequence variation in the material subjected to analysis and by the complexity reduction method deployed [8]. In many cultivated species in which selection through traditional and modern breeding reduced genetic diversity, DArT usually generates several hundreds highly reproducible markers in a single assay in a single biparental cross [6]. Another noteworthy property of DArT markers is that their sequence is easily accessible. This distinguishes them from other random markers such as amplified fragment length polymorphisms (AFLPs) and offers interesting perspectives in functional genomics. Overall, these characteristics make DArT a method of choice for non-model species [9] when it comes to assess genetic variation at the genome scale, to construct quantitative trait loci (QTL) or linkage maps, or to conduct genomic scans in order to track loci under selection in the genome.

The DArT technique was applied for the first time to the rice genome [5]. Thereafter, it has met an increasing suc-

cess and was developed for a wide range of crop and plant species [6,9-11] and was even used to identify soil micro-organisms [12]. However, despite an initial proof-of-concept work on mouse (Jaccoud, pers. comm.), attempts to develop DArTs for animals have been strongly delayed so far. This can be explained by differences in genome organization between plants and animals, demanding significant changes in the complexity reduction step.

This study has been motivated by research on the genetic basis of insecticide resistance in the mosquito *Aedes aegypti*, the primary vector species for the yellow fever and dengue viruses [13]. In particular, we were interested in characterizing genes linked to resistance to *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (Bti), a soil bacterium producing insecticidal crystal proteins which are widely used for controlling *Aedes* mosquito larvae [14]. In order to identify these genes, we chose to adopt a population genomics approach, i.e. to screen the genome of *Ae. aegypti* to detect loci showing a signature of selection by Bti. A prerequisite was thus to obtain many (several hundreds) random markers that could be surveyed at low cost and effort, and the DArT technology appeared as an appealing option for this purpose given the current shortage of SNPs markers isolated in *Ae. aegypti*.

In this article, we present a modification of the complexity reduction step of the DArT protocol taking advantage of the abundance of transposable elements (TEs) in many eukaryote genomes. Indeed, most TEs have conserved sequence motifs which can serve as specific anchors for the primers used to amplify fragments from the DArT genomic representation. Here, we implement the DArT technique for *Aedes aegypti* by targeting a TE called *Pony*, which belongs to the miniature inverted repeat transposable element (MITE) family of TEs and can be found in many copies in the genome of *Ae. aegypti* [15]. We show that this method is powerful enough to detect DNA polymorphisms even between populations separated by only a few generations of artificial selection. Beyond these promising results, this example testifies of the flexibility of the DArT technology and opens new prospects as regards its application to a wider range of species, including animals which have been refractory to it so far.

Results

Principle of the new complexity reduction method implemented

The DArT technique is based on the analysis of "genomic representations", which are simplified surrogates of the DNA samples of interest. Concretely, a genomic representation is a set of DNA fragments of various sizes and sequences which are characteristic of the studied sample and obtained through highly reproducible (and preferentially technically simple) methods. These methods are

usually based on restriction digestion: genomic DNA is digested using one or several restriction enzymes, with simultaneous ligation of appropriate adaptors to the restriction fragments and subsequent amplification of fragments by PCR using the adapter and the restriction site as targets for primer annealing [6]. A suitable genomic representation typically includes 5,000–20,000 amplified fragments, i.e. a number low enough to ensure the reproducibility of the PCR reaction, but high enough to yield a reasonable number of polymorphic markers. Fragment sizes are ideally evenly distributed in a 100–1000 bp range, and representations showing distinct bands on agarose gel are avoided because these are presumably derived from repetitive genomic sequences and/or mitochondrial or chloroplast DNA.

In *Ae. aegypti*, several restriction enzyme combinations were tested (Additional file 1), but all of them gave genomic representations unfavourable to the application of the traditional DArT protocol, with clear repetitive bands and/or an unsuitable range size for the fragments (See Additional file 2 for an example of poor-quality genomic representations). On the basis of these results, a different strategy was thus adopted. The underlying idea was to exploit any kind of motifs occurring frequently in the genome as a second anchor during the PCR reaction,

in addition to the adaptor-ligated restriction site. By adjusting PCR conditions, it was possible to preferably amplify fragments with the restriction site on one extremity and the chosen motif on the other one, so that the genomic representations to be obtained were expected to be a mixture of such fragments. Because of their abundance in eukaryote genomes, TEs were good candidates for such a purpose. We selected a particular MITE family named *Pony* to perform the role of second anchor in the *Ae. aegypti* genome (Figure 1). *Pony* TEs have all the characteristics of MITEs, including terminal inverted repeats, A+T richness and a small size [15]. Two highly divergent subfamilies, *Pony-A* and *Pony-B*, can be distinguished and occur in about 8,400 and 9,900 copies in *Ae. aegypti* genome, respectively [15]. We designed a primer targeting any *Pony* sequence present in the genome (*PonyAll* primer; Table 1), as well as one specific to the *Pony-B* subfamily (*PonyB* primer; Table 1).

Evaluation of the MITE display approach for DArT genotyping

A library comprising 6144 DArT clones was constructed using the approach described in Figure 1 (see *Methods* for details). Hybridizations were performed for 58 *Aedes aegypti* individuals with two, three and four replicated representations independently hybridized for 25, 4 and 29

Table 1: Adaptor and primer sequences used for preparation of genomic representations and library construction

	Adaptors (5'-3')	Primers (5'-3')
BspI286I restriction site		
Preparation of genomic representations for genotyping	BspI286I adaptors I	BspI286I primer I
	<ul style="list-style-type: none">Forward strand: equimolar mix of CATAGGTGTCCACAGTCGGTCTGCA CATAGGTGTCCACAGTCGGTCTGCT CATAGGTGTCCACAGTCGGTCTGC CReverse strand GACCGACTGTGGAC	AGGTGTCCACAGTCGGTCT
Library construction	BspI286I adaptors II	BspI286I primer II
	<ul style="list-style-type: none">Forward strand: equimolar mix of CTGAGTAGTGCCAGAACGGTCTGC A CTGAGTAGTGCCAGAACGGTCTGC C CTGAGTAGTGCCAGAACGGTCTGCTReverse strand GACCGTTCTGGCA	CTGAGTAGTGCCAGAACGGTC
Pony sequence	-	I536-clone preliminary library construction PonyAll primer CGNAATNTGARYCAAAACGGTA 4608-clone expanded library construction and preparation of genomic representations for genotyping PonyB primer GGANGCGTATTCTTYACCCAC

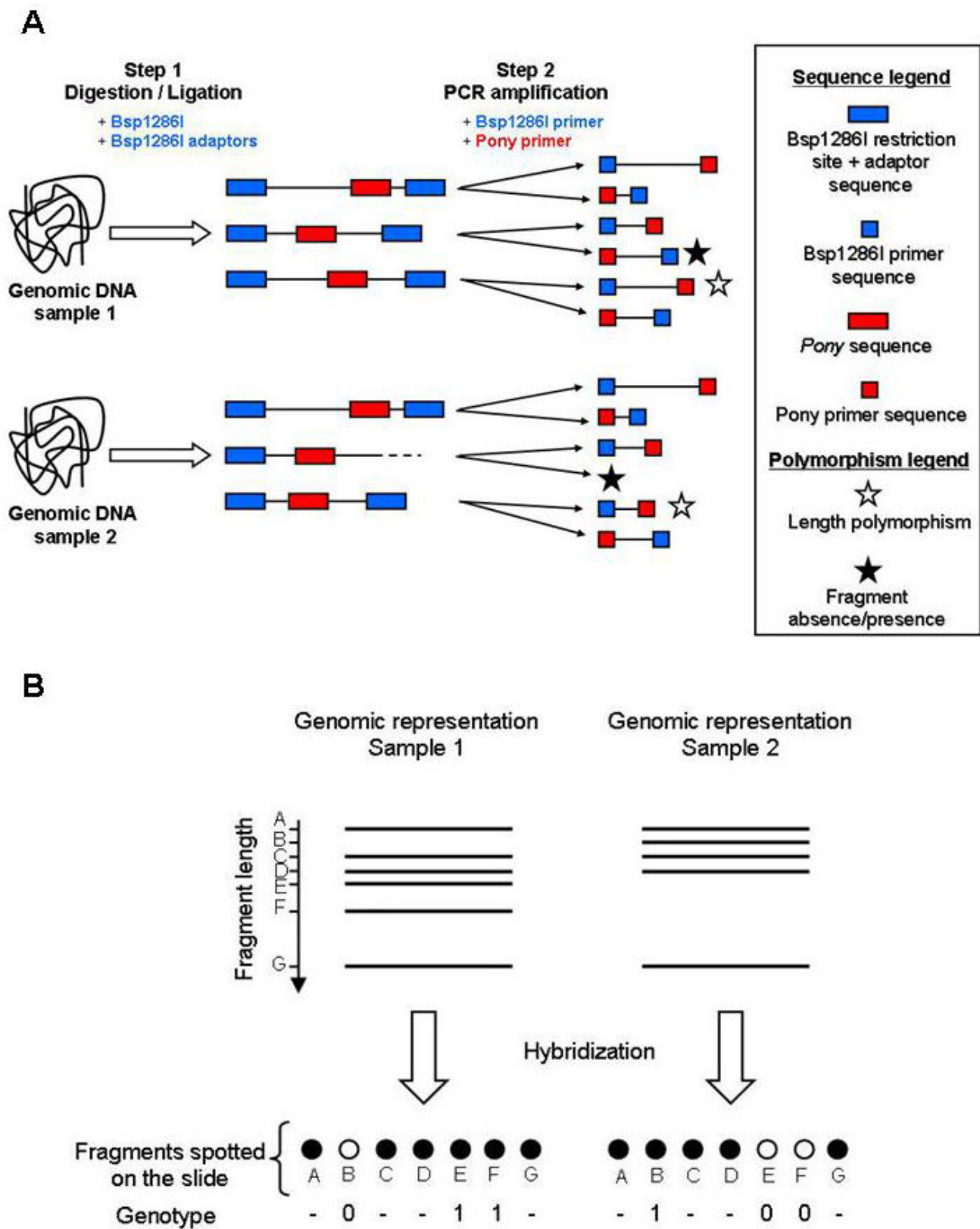


Figure 1 (see legend on next page)

Figure 1 (see previous page)

Schematic illustration of the DArT protocol. (A) Principle of the MITE-based genome complexity reduction method. Genomic DNA is digested by restriction enzyme BspI286I, and BspI286I adaptors are ligated to the generated overhangs. Then two rounds of PCR amplifications are performed using two primers: one annealing to BspI286I adaptors (BspI286I primer), and one complementary to a conserved sequence motif of the *Pony* element. For the most part, the resulting genomic representations include fragments with the BspI286I restriction site on one extremity and the *Pony* motif on the other one, because the PCR conditions are adjusted to preferably amplify this particular type of fragments. (B) Principle of the polymorphism detection on DArT microarrays. Genomic representations of each sample are hybridized against a library containing all fragments spotted on a slide. When a fragment is missing in one representation, it will not hybridize to the corresponding fragment on the slide. In this example, monomorphic fragments present in both representations are scored as '-' while polymorphic fragments present or absent in one representation are scored as '1' or '0', respectively.

individuals, respectively. These *Ae. aegypti* individuals belonged either to the Bora-Bora strain (29 individuals), susceptible to all insecticides, or to a strain artificially selected for several generations to develop resistance to the insecticidal *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (*Bti*) toxins (29 individuals; see *Methods*).

The polymorphism analysis was performed on the obtained images focusing on three parameters which are central for the data quality: (1) the Call Rate, which corresponds to the percentage of successfully scored replicates for a given marker; (2) the *P* value, which measures the fraction of the total variation across all individuals due to bimodality (i.e. polymorphism) for a particular marker; and (3) the discordance, which measures the overall variation of scores within replicates and is thus an indication of the marker reproducibility. First, the most unreliable markers (discordance > 5%) were discarded from the analysis. The remaining markers were then sorted out by decreasing *P* values and grouped in bins with an increment of 50 markers between two successive bins. As shown in Figure 2A, the average discordance increased as the average *P* value of a marker group increased (Pearson correlation coefficient = -0.996, $p < 0.01$). There was also a quasi-linear relationship between the decrease in average *P* and the decrease in Call Rate (Pearson correlation coefficient = 0.999, $p < 0.01$; Figure 2B). Overall, the top 350 markers ($P = 80.06\%$) showed a satisfactory Call Rate (88.90%) while displaying an acceptable level of discordance (1.48%). They met the standard quality thresholds usually applied to DArT data, giving a polymorphism rate of about 5.7% in the whole mosquito dataset.

Working dataset and marker redundancy

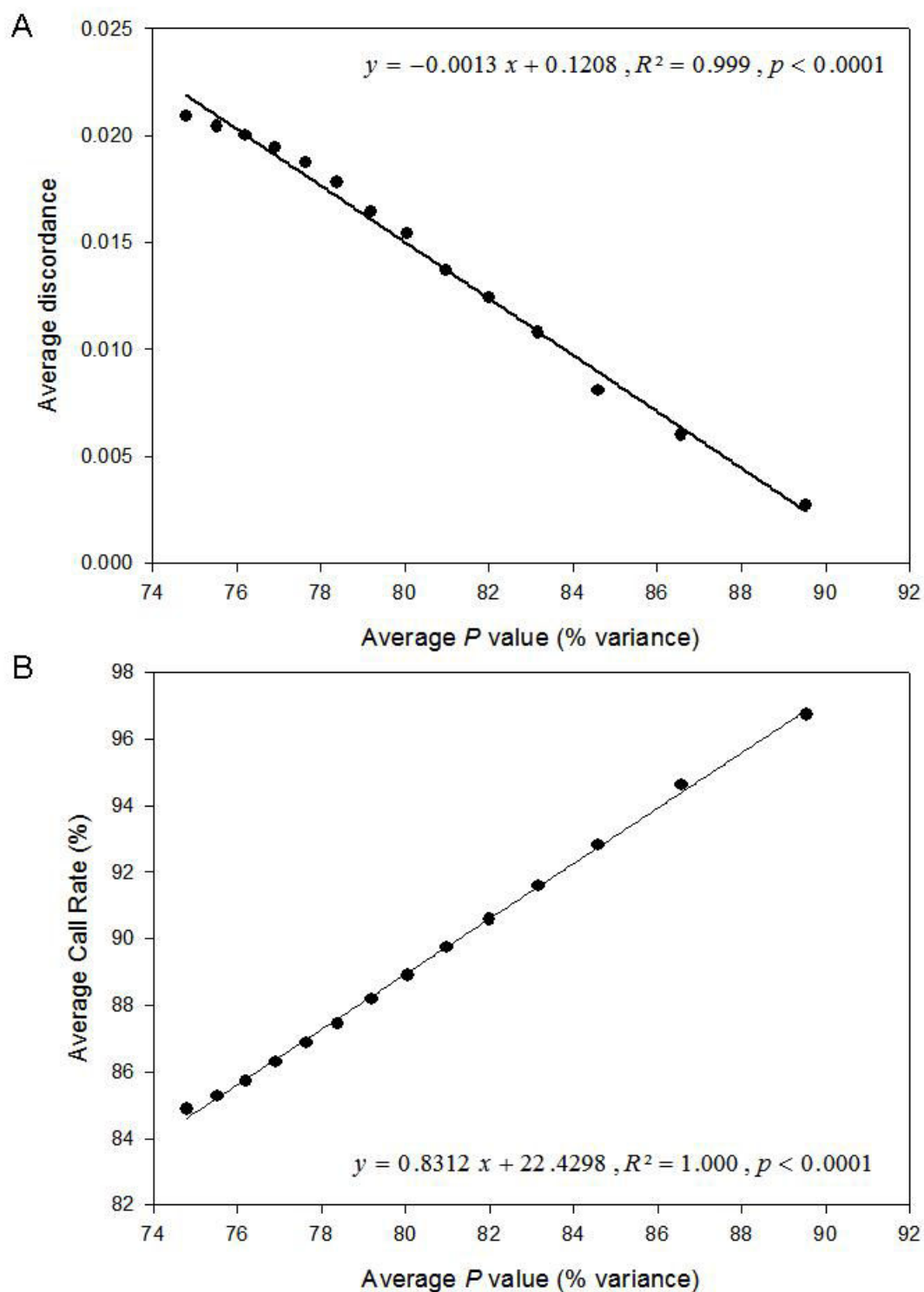
The primary goal of this study was to characterize loci potentially responsible for resistance to *Bti*. For this purpose, population genomics was adopted to reveal loci displaying apparent selection footprints, such as an atypical pattern of genetic variability compared to the rest of the genome. To implement this approach, a robust estimation of the overall genetic diversity throughout the genome first had to be obtained. This was achieved by slightly

relaxing the quality parameters to include more markers in our analyses and allow a more comprehensive sampling of the genome. A polymorphism analysis was thus performed with a minimum Call Rate, minimum *P* value, and maximum discordance set at 81%, 71%, and 5%, respectively. It identified a set of 476 markers (polymorphism rate = 7.75%) with a mean Call Rate, *P* value, and discordance of 87.72 %, 78.34 %, and 1.93%, respectively.

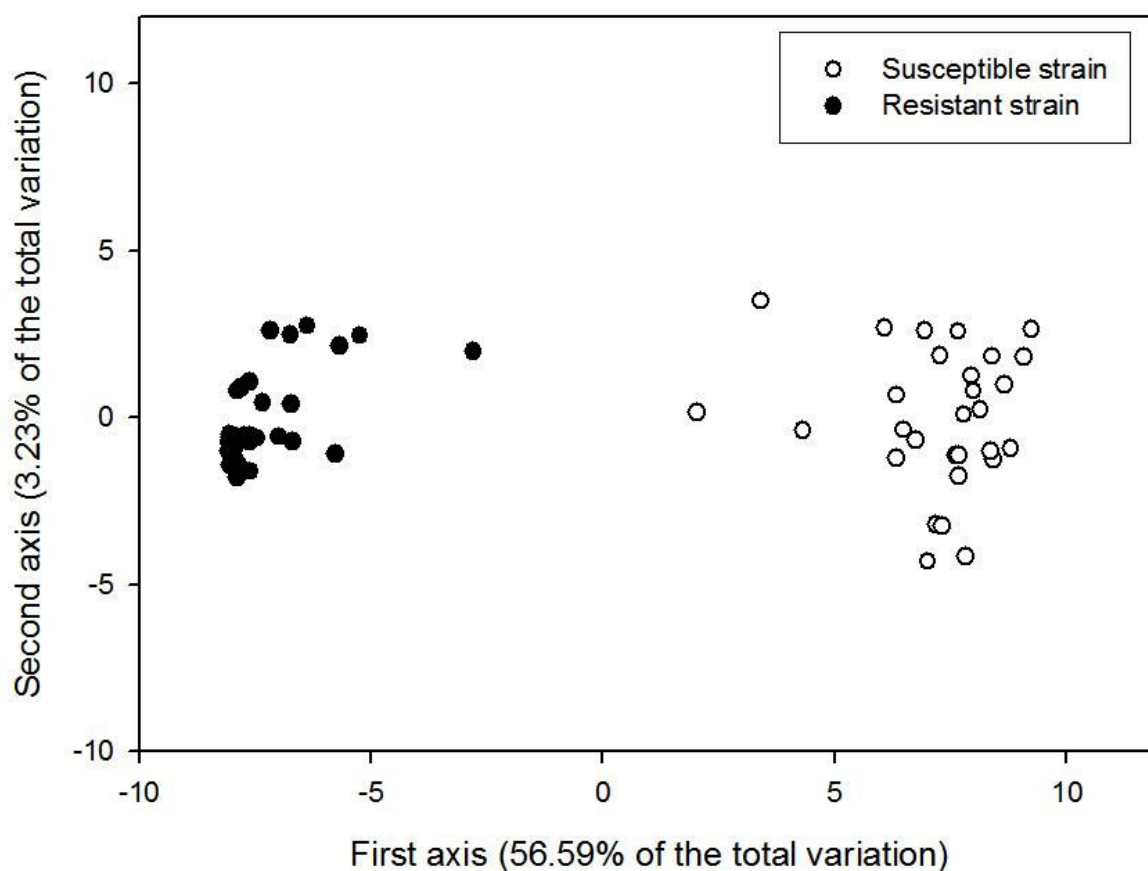
In this working dataset comprising 476 markers, linkage disequilibrium was low with only 0.72% and 1.90% of pairwise linkage indices > 0.95 and < 0.05, respectively. Furthermore, a subset of 70 markers involved in 76.92% of the marker pairs showing high linkage disequilibrium was sequenced. Only two of them (2.86%) turned out to be redundant, with one pair of markers differing by a gap and the second one by a mutation (similarity > 98.5% in BioEdit). After trimming the *Pony* motif, the 68 unique marker sequences (GenBank accession no. [FJ231034–FJ231090](#); sequences shorter than 50 bp could not be deposited) were blasted against the *Ae. aegypti* genome. In total, 41 of them could be assigned without ambiguity to single genomic positions distributed on 40 different supercontigs. The two markers situated on the same supercontig were separated by more than 215 kb.

Assessment of genetic diversity between and within mosquito strains

The working dataset was used to assess the genetic diversity observed between and within the two studied mosquito strains. As revealed by an analysis of molecular variance (AMOVA), most of the genetic variation was distributed between the resistant and the susceptible strains (69.6 %, versus 30.4 % within strains; $p < 0.0001$ in both cases), corroborating the high genetic differentiation observed between the two strains ($F_{st} = 0.556$). Likewise, in a principal coordinate analysis (PCO), the first axis unmistakably separated the two strains and explained 56.59 % of the variation (Figure 3). However, when the PCO analysis was carried out on each strain independently, enough genetic diversity seemed to be retained

**Figure 2**

Relationships between different quality parameters in the MITE library. After discarding the most unreliable markers (discordance > 5%), remaining markers were sorted out by decreasing *P* values and grouped in bins with an increment of 50 markers between two successive bins. Within-group average *P* was plotted against within-group average discordance (**A**) and within-group average Call Rate (**B**).

**Figure 3**

Principal coordinate analysis. A principal coordinate analysis (PCO) was carried out with the working dataset (476 DArT markers), and for each *Aedes aegypti* individual, the coordinate obtained for the first axis of the PCO was plotted against that obtained for the second axis.

within each strain to clearly differentiate individuals (data not shown), with the first two axes explaining 20.48 % and 26.72 % of the variation for the susceptible strain and the resistant strain, respectively.

Assessment of genetic diversity within strains allowed to complete this picture and revealed a strong difference

between the two strains (Table 2). All the diversity indices calculated (Shannon index of phenotypic diversity *S*, mean Jaccard pair-wise coefficient, Nei's gene diversity and proportion of polymorphic markers at the 5% level, see *Methods* for more details) give evidence of a high level of genetic diversity within the susceptible strain, whereas

Table 2: Indices of genetic diversity within each mosquito strain

Diversity index	Susceptible strain	Resistant strain
Mean pairwise Jaccard coefficient (minimum – maximum)	0.350 (0.196 – 0.643)	0.331 (0.110 – 0.590)
Shannon index of phenotypic diversity <i>S</i>	0.451	0.275
Nei's gene diversity	0.341	0.207
Percentage of polymorphic markers at the 5% level	94.1	58.6

these indices were substantially lower for the resistant strain, except the mean pairwise Jaccard coefficient.

Discussion

In this article, we report a substantial refinement to the DArT genotyping technique which allowed its implementation for the yellow fever mosquito *Aedes aegypti*. More specifically, the genome complexity reduction step was achieved thanks to a MITE-display procedure which utilizes the *Ae. aegypti* *Pony* element [15] as an additional primer anchor. After restriction digestion of genomic DNA and ligation of specific adaptor to compatible ends, *Pony*-containing fragments were amplified using two primers, one annealing to the adaptor sequence and the other to a conserved sequence motif of the *Pony* element (Figure 1).

In the 6144-clone library we generated, the relationships observed between the quality parameters (Call Rate, *P* value and discordance) for the best markers were consistent with those reported in other species, for example wheat (see Figure 1 in [7]). It has to be noted that the mean discordance, although acceptable, is 3–5 times higher than that usually published in plants [6,7,11]. Genomic representations generated with the MITE procedure are potentially more complex, and there is also a competition for amplification between three types of fragments (i.e., "Restriction enzyme-Restriction enzyme" fragments, "Restriction enzyme-*Pony*" fragments, and "*Pony-Pony*" fragments). Both of these factors may contribute to increase the mean discordance in the MITE procedure compared to the traditional DArT protocol. In any case, the discordance parameter can be viewed as a genotyping error rate, and the value reported here (1.48%) is excellent in comparison to those typically obtained with other marker systems [16]. This high reproducibility of the DArT technique is mainly due to the routine practice of systematically genotyping samples at least twice, in order to discard unreliable markers as soon as the scoring step. Another reason of this high data quality is the computerized scoring of DArT markers, which transforms detected fluorescence intensities into presence/absence of a given fragment and limits scoring subjectivity.

Our MITE approach was successful to reveal a substantial number of DNA polymorphisms in the two closely related laboratory strains of *Ae. aegypti* studied here, with 5.70 % of highly reliable polymorphic markers in the library. This polymorphism rate is slightly lower than that obtained in other species where the MITE procedure has also been tested, probably because of an inherent lower diversity in the laboratory material studied here. In the sugarcane genome, for example, 9.78 % of the cloned fragments turned out to be polymorphic with similar average quality parameters (Heller-Uszynska *et al.*, submitted).

Our working dataset, containing 476 polymorphic DArT markers selected with less stringent quality parameters, helped highlight substantial genetic differences between the two mosquito strains, with an observed *Fst* value reaching 0.556. Although the two strains diverged only 18 generations ago, this high level of genetic differentiation was not surprising in the light of the intensity of selection (80%) applied to the selected strain at each generation. In addition to this strong inter-strain genetic structure, the DArT dataset was also able to reveal high genetic diversity within both strains. Linkage analyses combined with marker sequencing also suggested that most of the markers were unique and scattered in the genome, and thus that our results could not be overly inflated by redundant or physically linked markers. In short, DArT markers appear to be discriminatory at both the intra- and inter-population levels, and have therefore the potential to become valuable tools in population genomics, even if they have not been used in this purpose so far.

As exemplifies by our study and others in molecular genotyping [17,18], TEs can be wonderful devices to help identify DNA polymorphisms. They are not only omnipresent in most genomes, but also tightly associated with various types of genetic variability, from changes in genome size and arrangement to single nucleotide mutations [19]. MITEs are particularly fascinating in this respect. The mode of transposition of most MITE families discovered so far has long remained mysterious [20,21]. They lack an active transposase, but according to recent studies, they seem to originate from ancestral autonomous TEs and to depend on transposases encoded by related autonomous TEs for contemporary transposition events [21,22]. Incidentally, there are hints indicating that stress may be a triggering factor in contemporary transposition events of MITEs [20]. In our case, one can speculate that the stress represented by insecticide selection could have played a role in shaping the strong genetic structure between the two strains. Moreover, despite their apparently deficient transposition capability, MITEs are usually present in high copy numbers in many eukaryote genomes. For example, the *Tourist* MITE superfamily represents alone more than 3 % of the rice genome [23], and between 10^3 and 10^4 copies of the *Angel* element can be found in the zebrafish genome [24]. MITEs also generally display well conserved motifs, which is particularly convenient for primer design [22]. Last but not least, they tend to insert in or near transcriptionally active genomic regions [20,21]. This particularity offers exciting prospects in studies of phenotypic traits of economical interest, or in genomic surveys tracking genes under selection. Interestingly, transposable elements often initiate the rapid evolution of insect resistance to insecticides, including resistance to *Bt* toxins [25,26]. In *Ae. aegypti*, DArT markers with atypically high genetic differentiation between

the susceptible and resistant strains might thus be linked to genes involved in resistance to *Bti* toxins. Some of these markers have already been sequenced and at least two promising candidate genes have been identified in their vicinity (Paris, pers. comm.).

Conclusion

The MITE approach described here (Figure 1) allowed obtaining the first DArT dataset ever published for an animal genome, although it has to be noted that the DArT method had previously been successfully developed for the mice genome (Jaccoud, pers. comm.). This example in *Ae. aegypti* testifies of the flexibility of the DArT genotyping technique, which can accommodate a wide range of other strategies for genome complexity reduction. Its quasi-universal applicability, the fact that limited genome information is necessary to its development, the possibility to obtain markers near coding regions and the possibility to rapidly sequence markers of interest are some of the features that can make DArT a serious competitor to other markers such as SNPs in non-model organisms [9]. In particular, DArT has a role to play in the current burst of whole-genome scans tracking signatures of selection in order to unravel the genetic basis of adaptation [2,27].

Methods

Biological material used and selection of the resistant strain

Two laboratory strains of *Ae. aegypti* were used as biological material in this study: the standard Bora-Bora strain, susceptible to all insecticides, and a strain artificially selected for several generations to develop resistance to a decomposed tree leaf litter showing a high toxicity when ingested by mosquito larvae. This toxic litter was proved to contain *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* (*Bti*) bacteria strains from commercial origin [28]. *Bti* bacterium produces insecticidal toxins which are widely used for mosquito control, and the toxic litter was collected in a mosquito pond in Eastern France three months after treatment with commercial *Bti* insecticide (Bactimos, Valent Biosciences Corporation). This experimental design allowed us to study resistance mechanisms to *Bti* toxins in a situation close to field conditions.

Selection of the toxic leaf litter resistant strain was performed on early fourth-instar larvae of the Bora-Bora strain. At each generation, groups of 200 calibrated larvae were exposed to 30 mg of finely ground toxic leaf litter in 200 ml of tap water. Selection was carried out repeatedly for 18 generations, with an average of 2000 larvae being exposed to toxic litter per generation. At each generation, the experiment was stopped when mortality reached 80% in order to obtain a minimum of 300 adults for the next generation. The survivors were transferred to clean water, fed with hay pellets, and allowed to emerge as adults,

reproduce, blood feed and lay eggs for the next generation. The average generation turnover was 30 days.

To monitor the evolution of resistance to toxic leaf litter, bioassays were conducted at each generation in plastic cups containing 20 fourth-instar larvae in 50 ml of tap water and various doses of toxic leaf litter [29]. The lethal dose for 50% of individuals after 24 h exposure (24 h-LD₅₀) was determined using the Probit software [30]. The resistance ratio (RR) of the selected strain was calculated by dividing the 24 h-LD₅₀ value of the selected strain with the value obtained for the susceptible strain. After 18 generations of selection, the RR of the resistant strain was 4-fold.

Genomic DNA extraction

Genomic DNA was extracted from fourth-instar larvae using the Qiagen DNeasy Tissue Kit and protocol (Qiagen). To avoid bacterial contamination, the larvae midgut was removed carefully before DNA extraction.

Preparation of genomic representations

For each sample, digestion and ligation reactions were carried out simultaneously at 37°C for 3 hours on 50 ng of genomic DNA, using 2 units of restriction enzyme Bsp1286I (New England Biolabs, NEB), 80 units of T4 DNA ligase (NEB) and 0.05 µM Bsp1286I adaptors I (Table 1), in a buffer with final concentrations of 10 mM Tris-OAc, 50 mM KOAc, 10 mM Mg(OAc)₂, 5 mM DTT (pH 7.8), 1 mM ATP and 100 ng/ml Bovine Serum Albumin (NEB). The obtained ligated products served as template in a first round of PCR amplification. For this purpose, ligated products were diluted five times with sterile water and 2.5 µl of the diluted product were added to a 22.5-µl PCR reaction mix leading to final concentrations of 0.04 µM of Bsp1286I primers I (Table 1), 0.4 µM of PonyB primers (Table 1), 10 mM Tris-Cl (pH 8.3), 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.1 mM of each dNTP and 1 unit of RedTaq DNA Polymerase (Sigma). The amplification reaction was performed with the following conditions: 94°C for 1 min; 20 cycles of 94°C for 30 sec, 50°C for 40 sec and 72°C for 1 min; followed by a final 7-min extension step at 72°C. The resulting PCR product was diluted 5 times with sterile water and 2.5 µl of the diluted product served as a template for a second round of amplification performed exactly as the first round except that the final volume was 50 µl, the final concentration of both primers and of each dNTP was 0.2 µM and 0.05 mM, respectively, and 2 units of RedTaq DNA polymerase were used.

Construction of the DArT library and printing of microarrays

A preliminary 1536-clone library was first constructed based on genomic representations prepared for 29 individuals of each strain. These representations were

obtained as described above, except the sequences of the adaptors and primers were slightly different (Bsp1286I adaptors II, Bsp1286I primer II and PonyAll primer; see Table 1), allowing the amplification from any type of *Pony* element (subfamily A or B). Representations were mixed according to the origin of the individuals to form a "susceptible pool" and a "resistant pool", and these pools were cloned separately in the PCR2.1 TOPO vector (TOPO TA Cloning kit, Invitrogen) following the manufacturer's instructions. Individual clones were grown overnight in 384-well plates containing LB medium with 100 µg/ml ampicillin and 4.4 % glycerol. Small aliquots of the cultures were used as templates for insert amplification in a 25-µl reaction containing 0.2 µM of each M13 forward and M13 reverse primers (Invitrogen), 50 µM of each dNTP, 50 mM Tris, 6 mM HCl, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 1.5 mM MgCl₂ and 2 units of Taq Polymerase. The cycling conditions were as follows: 95°C for 4 min, 57°C for 35s, 72°C for 1 min followed by 35 cycles of 94°C for 35s, 52°C for 35s and 72°C for 1 min and final 72°C for 7 min. After amplification, PCR products were dried, washed with 70% ethanol and resuspended in a spotting buffer developed for poly-L-lysine coated microarray slides (Wenzl *et al.*, in prep.). The final library contained 1536 clones, half of them originating from the "susceptible pool" and half of them from the "resistant pool", so that each pool of genetic diversity was equally represented.

The first genotyping experiments carried out with this preliminary library resulted in a low number of reliable polymorphic clones due to high levels of background noise in signal intensities (data not shown). One likely explanation was that the genomic representations hybridized against the library included too many fragments so that some of them were amplified stochastically during the two rounds of PCRs and/or did not hybridize specifically. To solve this problem, a second library was built, which was based on genomic representations with fewer fragments. It relied on the use of the PonyB primer designed to anneal only to the *Pony-B* sequences. Except for this different primer, the protocol was identical to that detailed above and lead to the production of a 4608-clone library. Clones from both libraries, i.e. 6144 in total, were printed in duplicates on poly-L-lysine-coated slides (Erie Scientific) using a *MicroGridIII* arrayer (Biorobotics). Printed DNA spots were denatured and fixed on the surface of the slide by incubation in hot water (95°C) for 2 min, followed by dipping in 0.1 mM DTT, 0.1 mM EDTA solution and drying by centrifugation at 500 × g for 7 min.

Individual genotyping using DArT microarrays

For each individual, at least two genomic representations were obtained independently as reported in the section "Preparation of genomic representations". Each representa-

tion was subsequently precipitated with one volume of isopropanol, washed with 70% ethanol and resuspended in 3.5 µl of sterile water. After a 3-min denaturation at 95°C, the representation was fluorescently-labelled for 3 hours at 37°C with 250 units of Klenow exo⁻ fragment of *E. coli* Polymerase I (NEB), 2.5 nmoles of either Cy3-dUTP or Cy5-dUTP (Amersham Bioscience) and 25 µM random decamers. A Cy3- and a Cy5-labelled samples (thereafter called targets) were combined one after the other to 60 µl of a hybridization buffer containing a 50:5:1 mixture of ExpressHyb (Clontech), herring sperm DNA (Promega), FAM-labelled polylinker of the PCR2.1 vector (Invitrogen) used for library preparation, and 2 mM EDTA (pH 8.0). This mix was denaturated at 95°C for 3 min, deposited onto microarray slides and covered with a glass coverslip. Slides were incubated for 16 h in a humid chamber at 65°C. Following hybridization, coverslips were removed and slides were washed in 1 × SSC + 0.1% SDS for 5 min, 1 × SSC for 5 min, 0.2 × SSC for 2 min, and 0.02 × SSC for 30 sec, before being dried by centrifugation at 500 g for 7 min.

Microarray scanning and data acquisition

A Tecan LS300 confocal laser scanner was used to scan the hybridized slides and generate three different TIF images per slide, one per type of hybridized dye (Cy3, Cy5 and FAM). Image and polymorphism analyses were performed with *DArTSoft* version 7.4.3, a software especially developed for this purpose by *Diversity Arrays Technology Pty. Ltd.* (Cayla *et al.*, in prep.). Briefly, *DArTSoft* automatically localizes the arrayed spots on the images using a seeded-region-growth algorithm, rejects those with a weak reference signal, computes and normalizes background-subtracted relative hybridization intensities [e.g. log(cy3-target/FAM-reference)], and calculates the median value for replicate spots. Then, polymorphic clones are identified by means of a combination of ANOVA and fuzzy K-means clustering at a fuzziness level of 1.5 before being assigned as 'present' or 'absent' in each representation hybridized to the array.

Linkage disequilibrium between markers and clone sequencing

Independence and uniqueness of DArT markers were evaluated by calculating the linkage index $I_{k,l}$ for each possible pair of markers k and l , according to the following formula:

$$I_{k,l} = \frac{1}{n} \sum |m_{ki} - m_{li}|$$

where n is the number of individuals, m_{ki} the score (0/1) of individual i at marker k , and m_{li} the score of individual i at marker l . Values of $I < 0.05$ or $I > 0.95$ are indicative of

a statistical linkage disequilibrium between the two markers under consideration.

A subset of markers involved in pairs showing high linkage disequilibrium was selected and sequenced to assess the level of marker redundancy in the dataset. For these markers, bacterial cultures were sent to Genome Express® (<http://www.genome-express.com>) for insert amplification and sequencing with M13 forward and M13 reverse primers. Raw sequence files were trimmed and aligned using Bioedit 7.0.9 (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html>). Marker sequences were also blasted against the full genomic sequence of *Ae. aegypti* (available for download at <http://aaegypti.vectorbase.org/GetData/Downloads?type=Genome> and comprising 4758 supercontigs in total).

Evaluation of genetic diversity between and within mosquito strains

Genetic variation was assessed within each mosquito strain by computing the Shannon index of phenotypic diversity *S* [31] with Popgene v1.32 (<http://www.ualberta.ca/~fyeh/pr01.htm>) as well as the pair-wise Jaccard coefficients [32] with the vegdist function of the vegan R package (<http://cc.oulu.fi/~jarioksa/softhelp/vegan.html>). These two diversity indices do not rely on the estimation of allelic frequencies, which for dominant data such as DArT data requires additional assumptions (e.g. Hardy-Weinberg equilibrium). In addition, estimates of allelic frequencies were obtained with the Bayesian method with non-uniform prior distribution [33] implemented in AFLP-SURV v1.0 (<http://www.ulb.ac.be/sciences/lagev/aflp-surv.html>) [34], and used to calculate Nei's gene diversity [35] and the proportion of polymorphic markers at the 5% level within each strain. Genetic differentiation between strains was estimated by performing an analysis of molecular variance (AMOVA) using Arlequin v3.11 (<http://cmpg.unibe.ch/software/arlequin3/>) [36] and by calculating the *F*_{st} index with AFLP-SURV v1.0. Principal coordinate analyses (PCO) were carried out with PCO v1.0 (<http://www.stat.auckland.ac.nz/~mja/Programs.htm>).

Abbreviations

Bti: *Bacillus thuringiensis* var *israelensis*; AFLP: amplified fragment length polymorphism; DArT: Diversity Arrays Technology; MITE: miniature inverted repeat transposable element; TE: transposable element; SNP: single nucleotide polymorphism.

Authors' contributions

AB carried out the DArT experiments, analysed the data and drafted the manuscript. MP was in charge of the mosquito rearing, the bioassays, the DNA extractions and the sequence analyses, and wrote parts of the draft. LD and

JPD conceived the overall study and helped with the writing. GT took part to the sequence analyses. AK designed the MITE protocol, coordinated the data analysis and revised the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Additional material

Additional file 1

Enzyme combinations tested to implement the traditional DArT protocol on the genome of Aedes aegypti.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-459-S1.doc>]

Additional file 2

Example of a poor-quality genomic representation obtained with enzyme combination PstI + Tsp509I.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-9-459-S2.jpeg>]

Acknowledgements

The authors would like to thank Joëlle Patouraux for technical assistance in mosquito rearing, Sébastien Boyer for help with insecticide selection, and Mathieu Tilquin for providing recent data on toxic leaf litters. They are also grateful to Vanessa Caig and Margaret Evers for technical help with the DArT technique, and to Kasia Heller-Uszynska and Damian Jaccoud for constructive discussion during this work. AB and LD were funded by the Région Rhône-Alpes (grants #0501553401 and #0501545401, respectively) and MP, LD and JPD benefited from a collaborative grant attributed by the Démonstration Rhône-Alpes.

References

- Schlötterer C: **The evolution of molecular markers – just a matter of fashion?** *Nat Rev Genet* 2004, **5**:63-69.
- Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P: **The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing.** *Nat Rev Genet* 2003, **4**:981-994.
- Morin PA, Luikart G, Wayne RK, group atSw: **SNPs in ecology, evolution and conservation.** *Trends Ecol Evol* 2004, **19**:208-216.
- Barbara T, Palma-Silva C, Paggi GM, Bered F, Fay MF, Lexer C: **Cross-species transfer of nuclear microsatellite markers: potential and limitations.** *Mol Ecol* 2007, **16**:3759-3767.
- Jaccoud D, Peng K, Feinstein D, Kilian A: **Diversity Arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:e25.
- Wenzl P, Carling J, Kudrna D, Jaccoud D, Huttner E, Kleinhofs A, Kilian A: **Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:9915-9920.
- Akbari M, Wenzl P, Caig V, Carling J, Xia L, Yang S, Uszynski G, Mohler V, Lehmensiek A, Kuchel H, Hayden M, Howes N, Sharp P, Vaughan P, Rathmell B, Huttner E, Kilian A: **Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome.** *Theor Appl Genet* 2006, **113**:1409-1420.
- Kilian A, Huttner E, Wenzl P, Jaccoud D, Carling J, Caig V, Evers M, Heller-Uszynska K, Cayla C, Patarapuwadol S, Xia L, Yang S, Thomson B: **The fast and the cheap: SNP and DArT-based whole genome profiling for crop improvement.** In *The Wake of the Double Helix: From the Green Revolution to the Gene Revolution*; 27-31 May 2003; Bologna 2005:443-461.

9. James KE, Schneider H, Ansell SW, Evers M, Robba L, Uszynski G, Pedersen N, Newton AE, Russell SJ, Vogel JC, Kilian A: **Diversity Arrays Technology (DArT) for pan-genomic evolutionary studies of non-model organisms.** *PLoS ONE* 2008, **3**:e1682.
10. Wittenberg A, Lee T, Cayla C, Kilian A, Visser R, Schouten H: **Validation of the high-throughput marker technology DArT using the model plant *Arabidopsis thaliana*.** *Mol Genet Genomics* 2005, **274**:30-39.
11. Yang S, Pang W, Ash G, Harper J, Carling J, Wenzl P, Huttner E, Zong X, Kilian A: **Low level of genetic diversity in cultivated pigeon-pea compared to its wild relatives is revealed by diversity arrays technology.** *Theor Appl Genet* 2006, **113**:585-595.
12. Sessitsch A, Hackl E, Wenzl P, Kilian A, Kostic T, Stralis-Pavese N, Sandjong BT, Bodrossy L: **Diagnostic microbial microarrays in soil ecology.** *New Phytol* 2006, **171**:719-736.
13. Tomori O: **Yellow fever: The recurring plague.** *Crit Rev Clin Lab Sci* 2004, **41**:391-427.
14. Lacey LA: ***Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control.** *J Am Mosq Control Assoc* 2007, **23**:133-163.
15. Tu ZJ: **Molecular and evolutionary analysis of two divergent subfamilies of a novel miniature inverted repeat transposable element in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*.** *Mol Biol Evol* 2000, **17**:1313-1325.
16. Bonin A, Bellemain E, Bronken Eidesen P, Pompanon F, Brochmann C, Taberlet P: **How to track and assess genotyping errors in population genetics studies.** *Mol Ecol* 2004, **13**:3261-3273.
17. Behura SK: **Molecular marker systems in insects: current trends and future avenues.** *Mol Ecol* 2006, **15**:3087-3113.
18. Cornman RS, Arnold ML: **Phylogeography of *Iris missouriensis* (Iridaceae) based on nuclear and chloroplast markers.** *Mol Ecol* 2007, **16**:4585-4598.
19. Kidwell MG, Lisch DR: **Transposable elements and host genome evolution.** *Trends Ecol Evol* 2000, **15**:95-99.
20. Casacuberta JM, Santiago N: **Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes.** *Gene* 2003, **311**:1-11.
21. Jiang N, Feschotte C, Zhang XY, Wessler SR: **Using rice to understand the origin and amplification of miniature inverted repeat transposable elements (MITEs).** *Curr Opin Plant Biol* 2004, **7**:115-119.
22. Feschotte C, Jiang N, Wessler SR: **Plant transposable elements: Where genetics meets genomics.** *Nat Rev Genet* 2002, **3**:329-341.
23. Matsumoto T, Wu JZ, Kanamori H, Katayose Y, Fujisawa M, Namiki N, Mizuno H, Yamamoto K, Antonio BA, Baba T, Sakata K, Nagamura Y, Aoki H, Arikawa K, Arita K, Bito T, Chiden Y, Fujitsuka N, Fukunaka R, Hamada M, Harada C, Hayashi A, Hijishita S, Honda M, Hosokawa S, Ichikawa Y, Idonuma A, Iijima M, Ikeda M, Ikeno M, Ito K, Ito S, Ito T, Ito Y, Iwabuchi A, Kamiya K, Karasawa W, Kurita K, Katagiri S, Kikuta A, Kobayashi H, Kobayashi N, Machita K, Maehara T, Masukawa M, Mizubayashi T, Mukai Y, Nagasaki H, Nagata Y, Naito S, Nakashima M, Nakama Y, Nakamichi Y, Nakamura M, Meguro A, Negishi M, Ohta I, Ohta T, Okamoto M, Ono N, Saji S, Sakaguchi M, Sakai K, Shibata M, Shimokawa T, Song JY, Takazaki Y, Terasawa K, Tsugane M, Tsuji K, Ueda S, Waki K, Yamagata H, Yamamoto M, Yamamoto S, Yamane H, Yoshiki S, Yoshihara R, Yukawa K, Zhong HS, Yano M, Sasaki T, Yuan QP, Shu OT, Liu J, Jones KM, Gansberger K, Moffat K, Hill J, Bera J, Fadrosch D, Jin SH, Johri S, Kim M, Overton L, Reardon M, Tsitrin T, Vuong H, Weaver B, Ciecko A, Tallon L, Jackson J, Pai G, Van Aken S, Utterback T, Reidmuller S, Feldblyum T, Hsiao J, Zismann V, Iobst S, de Vazeille AR, Buell CR, Ying K, Li Y, Lu TT, Huang YC, Zhao Q, Feng Q, Zhang L, Zhu JJ, Weng QJ, Mu J, Lu YQ, Fan DL, Liu YL, Guan JP, Zhang YJ, Yu SL, Liu XH, Zhang Y, Hong GF, Han B, Choise N, Demange N, Orjeda G, Samain S, Cattolico L, Pelletier E, Couloux A, Segurens B, Wincker P, D'Hont A, Scarpelli C, Weissenbach J, Salanoubat M, Quetier F, Yu Y, Kim HR, Rambo T, Currie J, Collura K, Luo MZ, Yang TJ, Ammiraju JSS, Engler F, Soderlund C, Wing RA, Palmer LE, de la Bastide M, Spiegel L, Nascimento L, Zutavern T, O'Shaughnessy A, Dike S, Dedhia N, Preston R, Balija V, McCombie WR, Chow TY, Chen HH, Chung MC, Chen CS, Shaw JF, Wu HP, Hsiao KJ, Chao YT, Chu MK, Cheng CH, Hour AL, Lee PF, Lin SJ, Lin YC, Liou JY, Liu SM, Hsing YI, Raghuvanshi S, Mohanty A, Bharti AK, Gaur A, Gupta V, Kumar D, Ravi V, Vij S, Kapur A, Khurana P, Khurana P, Khurana JP, Tyagi AK, Gaikwad K, Singh A, Dalal V, Srivastava S, Dixit A, Pal AK, Ghazi IA, Yadav M, Pandit A, Bhargava A, Sureshbabu K, Batra K, Sharma TR, Mohapatra T, Singh NK, Messing J, Nelson AB, Fuks G, Kavchok S, Keizer G, Llaca ELV, Song RT, Tanyolac B, Young S, Il KH, Hahn JH, Sangsakoo G, Vanavichit A, de Mattos LAT, Zimmer PD, Malone G, Dellagostin O, de Oliveira AC, Bevan M, Bancroft I, Minx P, Cordum H, Wilson R, Cheng ZK, Jin WW, Jiang JM, Leong SA, Iwama H, Gojobori T, Itoh T, Niimura Y, Fujii Y, Habara T, Sakai H, Sato Y, Wilson G, Kumar K, McCouch S, Juretic N, Hoen D, Wright S, Bruskiewich R, Bureau T, Miyao A, Hirochika H, Nishikawa T, Kadowaki K, Sugiura M, Int Rice Genome Sequencing P: **The map-based sequence of the rice genome.** *Nature* 2005, **436**:793-800.
24. Izsvák Z, Ivics Z, Shimoda N, Mohn D, Okamoto H, Hackett PB: **Short inverted-repeat transposable elements in teleost fish and implications for a mechanism of their amplification.** *J Mol Evol* 1999, **48**:13-21.
25. Gahan LJ, Gould F, Heckel DG: **Identification of a gene associated with bit resistance in *Heliothis virescens*.** *Science* 2001, **293**:857-860.
26. Wilson TG: **Transposable elements as initiators of insecticide resistance.** *J Econ Entomol* 1993, **86**:645-651.
27. Storz JF: **Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence.** *Mol Ecol* 2005, **14**:671-688.
28. Tilquin M, Paris M, Reynaud S, Després L, Ravanel P, Géréma R, Gury J: **Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis israelensis* spores in mosquitoes' natural habitats.** *PLoS ONE* in press.
29. David JP, Rey D, Pautou MP, Meyran JC: **Differential toxicity of leaf litter to dipteran larvae of mosquito developmental sites.** *J Invertebr Pathol* 2000, **75**:9-18.
30. Raymond M, Prato G, Ratsira D: **Probability analysis of mortality assays displaying quantal response, version 3.3.** Praxeme, Saint Georges D'Orques, France; 1995.
31. Shannon CE: **A mathematical theory of communication.** *Bell System Technical Journal* 1948, **27**:379-423.
32. Jaccard P: **Nouvelles recherches sur la distribution florale.** *Bulletin de la Société Vaudoise des Sciences Naturelles* 1908, **44**:223-270.
33. Zhivotovskiy LA: **Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers.** *Mol Ecol* 1999, **8**:907-913.
34. Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldan-Ruiz I: **Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size.** *Mol Ecol* 2002, **11**:139-151.
35. Nei M: **Analysis of gene diversity in subdivided populations.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1973, **70**:3321-3323.
36. Excoffier L, Laval G, Schneider S: **Arlequin ver. 3.0: An integrated software package for population genetics data analysis.** *Evol Bioinform Online* 2005, **1**:47-50.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Chapitre 3 - Article 5

Candidate genes revealed by a genome scan for mosquito resistance to a bacterial insecticide: sequence and gene expression variation.

BONIN A, PARIS M, TETREAU G, DAVID JP, DESPRES L

BMC Genomics (2009) 10:551.

Research article

Open Access

Candidate genes revealed by a genome scan for mosquito resistance to a bacterial insecticide: sequence and gene expression variations

Aurélie Bonin^{*†}, Margot Paris[†], Guillaume Tetreau[†], Jean-Philippe David and Laurence Després

Address: Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS-UMR 5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble cedex 09, France

Email: Aurélie Bonin^{*} - abonin@indiana.edu; Margot Paris - margot.paris@e.ujf-grenoble.fr; Guillaume Tetreau - guillaume.tetreau@e.ujf-grenoble.fr; Jean-Philippe David - jean-philippe.david@ujf-grenoble.fr; Laurence Després - laurence.despres@ujf-grenoble.fr

^{*} Corresponding author [†]Equal contributors

Published: 21 November 2009

Received: 25 July 2009

BMC Genomics 2009, **10**:551 doi:10.1186/1471-2164-10-551

Accepted: 21 November 2009

This article is available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/10/551>

© 2009 Bonin et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Genome scans are becoming an increasingly popular approach to study the genetic basis of adaptation and speciation, but on their own, they are often helpless at identifying the specific gene(s) or mutation(s) targeted by selection. This shortcoming is hopefully bound to disappear in the near future, thanks to the wealth of new genomic resources that are currently being developed for many species. In this article, we provide a foretaste of this exciting new era by conducting a genome scan in the mosquito *Aedes aegypti* with the aim to look for candidate genes involved in resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) insecticidal toxins.

Results: The genome of a *Bti*-resistant and a *Bti*-susceptible strains was surveyed using about 500 MITE-based molecular markers, and the loci showing the highest inter-strain genetic differentiation were sequenced and mapped on the *Aedes aegypti* genome sequence. Several good candidate genes for *Bti*-resistance were identified in the vicinity of these highly differentiated markers. Two of them, coding for a cadherin and a leucine aminopeptidase, were further examined at the sequence and gene expression levels. In the resistant strain, the cadherin gene displayed patterns of nucleotide polymorphisms consistent with the action of positive selection (e.g. an excess of high compared to intermediate frequency mutations), as well as a significant under-expression compared to the susceptible strain.

Conclusion: Both sequence and gene expression analyses agree to suggest a role for positive selection in the evolution of this cadherin gene in the resistant strain. However, it is unlikely that resistance to *Bti* is conferred by this gene alone, and further investigation will be needed to characterize other genes significantly associated with *Bti* resistance in *Ae. aegypti*. Beyond these results, this article illustrates how genome scans can build on the body of new genomic information (here, full genome sequence and MITE characterization) to finally hold their promises and help pinpoint candidate genes for adaptation and speciation.

Background

In the past few years, evolutionary biologists have increasingly bet on population genomics approaches to study the genetic basis of adaptation and speciation. Genome scans have flourished in the literature, providing valuable insight into the genetics of local adaptation [1,2], sympatric speciation [3], host race or ecotype differentiation [4-7], and response to climate change or exotic invasions [8,9], among others. In most cases, however, population genomics alone fell short of pinpointing the specific gene(s) or mutation(s) targeted by selection during the adaptation or speciation process [10,11].

One of the main reasons for this recurring setback is the present lack of genomic resources for most examined species. For example, due to the absence of more powerful alternatives, many population genomics studies rely on genetic markers such as AFLPs (Amplified Fragments Length Polymorphisms) [11,12], which can generally be obtained easily for any organism. Unfortunately, such markers present the double disadvantage of being anonymous and of falling predominantly in non-coding regions of the genome, i.e. far from potential candidate regions for adaptation and speciation [10]. Moreover, when genomic sequences are scarce or poorly annotated, identifying candidate genes in the vicinity of markers showing a selection signature represents a daunting task that few researchers have undertaken so far (but see [13]). Yet, we predict that these limitations are bound to disappear in the near future, especially with the increasing use of next-generation sequencing technologies. In this article, we aim at providing a foretaste of this exciting new era by illustrating how new genomic tools can help unravel the genetic basis of mosquito resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) insecticidal toxins.

Considered as a safe alternative to chemical insecticides, the bio-insecticide *Bti* is widely used worldwide for mosquito control [14]. *Bti* toxicity is mainly conferred by three Cry toxins (Cry4A, Cry4B and Cry11A) and one Cyt toxin (Cyt1A), which aggregate in a proteic crystal produced during sporulation of the bacteria [15]. *Bti* is usually sprayed in mosquito breeding sites as a mixture of spores and toxins, which is ingested together with organic detritus by developing larvae. In the larval midgut, *Bti* toxins are first activated by protease/trypsin-like enzymes or aminopeptidases [16]. Then, they bind to specific receptors of the midgut cells (Cry toxins), or directly interact with the cell membrane (Cyt1A toxin), ultimately causing pore formation and cell lysis [16]. Cyt1A is also known to act synergistically with Cry toxins, increasing the overall toxicity of the *Bti* mixture [17,18]. Due to the complexity of *Bti* toxicity mechanisms, some have argued that resistance to *Bti* would likely require adaptive mutations in several genes [19,20]. This argument is reinforced by the fact that

only a handful of studies have observed evidence of laboratory or natural resistance to *Bti* in mosquito [19,21-23]. Because of the probable multilocus nature of *Bti* resistance, population genomics appears to be an approach of choice to identify genes involved in this process.

Here, we describe the application of population genomics to the search for candidate genes for resistance to a toxic leaf litter containing *Bti* spores. With the mosquito *Aedes aegypti* as a model, we first conducted a genome scan relying on about 500 MITE (Miniature Inverted-repeat Transposable Element)-derived markers expected to occur frequently in gene-rich regions [24,25]. By combining the results of this genome scan with data from the publicly available genome sequence of *Ae. aegypti*, we were then able to localize two good candidate genes for *Bti* resistance. Finally, these two genes were further analyzed at the sequence and gene expression levels in order to determine if selection was indeed a driving force in their evolution.

Results

Genome scan and identification of outlier loci presumably influenced by selection

Our search for candidate genes linked to *Bti* resistance was conducted in two *Aedes aegypti* strains differing drastically in their susceptibility to *Bti* as well as to individual *Bti* toxins (see the Methods part for resistance ratios). The genome of *Ae. aegypti* was screened using a variant of the DArT (Diversity Arrays Technology) procedure, where motifs of a particular MITE (Miniature Inverted-repeat Transposable Element) family called *Pony* served as primer anchors for PCR amplification. In total, 476 biallelic dominant markers were surveyed for 29 individuals in each mosquito strain, revealing a particularly high genetic differentiation between strains (mean F_{st} = 0.556). This strong genetic structure was not surprising given the history of the two strains, and in particular the recent bottleneck experienced by the resistant strain (Additional file 1). However, high neutral F_{st} values are expected to reduce the power of methods revealing outlier loci potentially under selection on the basis of an atypically high genetic differentiation. For example, the application of the program Dfdist [26] to our data detected only one locus departing from neutral expectations for α = 1%, because the neutral envelope included almost the entire range of possible differentiation values (Additional file 2). As a result, we adopted a different strategy and retained as outliers those loci for which alternative phenotypes (fragment presence/absence) were fixed or nearly fixed in each strain. A total of 70 such markers were sequenced for further analyses.

Outlier sequencing and localization in the genome

Among the outlier sequences obtained, one pair differed only by a gap and another one by only a mutation, result-

ing in a redundancy rate of 2.86%. After trimming the primer sequence and the *Pony* motif, the 68 unique marker sequences (GenBank accession no. [FJ231034-FJ231090](#); sequences shorter than 50 bp could not be deposited) had an average size of 185.2 bp (range 16-868 bp). Of these unique sequences, 41 could be assigned to a unique position in the *Aedes aegypti* genome, and all but two of these positions were found on different supercontigs (Additional file 3). Six sequences were situated on the same supercontig as a candidate gene for *Bti* resistance (DArT_102, DArT_318, DArT_400, DArT_415, DArT_432 and DArT_467), and two of them (DArT_432 and DArT_467) co-localized with the same gene (a cadherin). It had to be noted that physical distances between candidate genes and outlier markers situated on the same supercontig were considerable, ranging from 97907 bp (cadherin and DArT_467) to more than 300 Mbp (glycosyltransferase and DArT_415). According to these results, the cadherin gene (CAD, VectorBase Gene ID AAEL001196) turned out to be a serious candidate for *Bti* resistance because two outlier markers pointed towards it, one of them at the shortest distance recorded in this study. This gene, which codes for a possible toxin-binding receptor [27], was thus selected for further investigation at the sequence and expression levels. We also focused on the leucine aminopeptidase gene (LAP, VectorBase Gene ID AAEL001649) because of its potential implication in *Bti* toxin activation [28].

Candidate gene sequence analysis

A total of 1,467 bp and 1,657 bp were sequenced for the CAD and LAP genes, respectively. All sequences were deposited into GenBank, with accession numbers [GU066340](#) to [GU066385](#). As shown in Table 1, the two candidate genes shared similarities: both had a higher genetic diversity in the susceptible than in the resistant strain even if more individuals were sequenced in this latter. This observation was consistent with the fact that both strains are separated by 18 generations of selection, and that the resistant strain experienced a strong bottleneck at generation 10 (Additional file 1). Both genes also showed similar numbers of haplotypes in each strain (13 and 12 haplotypes in the susceptible strain for CAD and LAP, respectively; and 5 haplotypes in the resistant strain for both genes). On the other hand, the two candidate genes differed by their overall level of genetic diversity and inter-strain differentiation. For example, the *Fst* value was 0.186 only for CAD vs. 0.321 for LAP. Likewise, the nucleotide diversity estimated for LAP in the susceptible strain was about four times lower than that estimated for CAD, this ratio reaching 17 when considering the resistant strain. However, it has to be noted that polymorphisms were not uniformly distributed along the CAD gene sequence, some regions showing globally more variation (e.g. sub-domain SD4 and interdomain SD4-SD5 of the protein; Figure 1).

These patterns of genetic diversity translated differently at the codon level. We found three non-synonymous sites in the CAD sequence, of which none was diagnostic of one strain in particular, whereas for the LAP sequence, only two of nine non-synonymous mutations were present in the resistant strain. Six non-synonymous sites, among which five could only be found in the susceptible strain, were noticeably situated in 5' and 3' untranslated regions and could thus affect transcript stability and/or translation.

Finally, the examination of haplotype repartition between strains allowed this picture to be completed. For the CAD gene, one haplotype present in all 12 sampled resistant individuals (18 haplotypes out of 24) existed only in 2 susceptible individuals (2 haplotypes out of 20). For the LAP gene, the most frequent haplotype in the resistant strain (11 haplotypes out of 24) was absent from the susceptible strain.

Neutrality tests

For both candidate genes, we tested for deviation from neutral evolution in the resistant strain by applying different neutrality tests to the observed polymorphism data (Table 2). Tajima's *D* and Fay and Wu's *H* highlight a skew in the frequency distribution of variants, *H* giving more weight to high-frequency polymorphisms, whereas Fu and Li's *D** and *F** detect a discrepancy between either the total number of mutations (*D**) or the average number of differences between two sequences (*F**) and the number of singletons. As a result, each one of these tests is based on different diversity parameters and gives different information on the type of selection presumably in action. In this study, every test except Fay and Wu's *H* gave positive values for both genes (Table 2), which is consistent with the recent bottleneck experienced by the resistant strain. None of the tests was significant for LAP, whereas *D**, *F** and *H* remained significant for CAD even when accounting for the particular demographic history of the strain (Table 2). The positive values of *D** and *F** suggested a deficiency of recent (i.e. rare) mutations, whereas the negative *H* indicated an excess of high compared to intermediate frequency mutations.

Gene expression analyses

Real-time reverse-transcription PCR (RT-PCR) analyses revealed that levels of gene expression were reduced in the resistant strain compared to the susceptible strain for both candidate genes (2.17-fold and 1.68-fold under-expression for the CAD and the LAP genes, respectively; Figure 2). Non-parametric Mann-Whitney tests indicated that reduction in expression levels was significant for both genes ($p = 0.017$ and $p = 0.002$ for the CAD and LAP genes, respectively). However, only the expression fold change observed for the CAD gene (2.17) was higher than the

Table 1: Measures of genetic diversity and divergence obtained for the two candidate genes

Gene/Domain	Strain	Fragment size (bp)	N	Hap	S	Si	NS	Hd		w	k	K	Fst	
Cadherin (CAD)	Whole sequence*	Susceptible Resistant	1467	20 24	13 5	67 65	0 1	3 3	0.932 0.435	0.023 0.017	0.013 0.012	32.363 25.033	35.254	0.186
	SD2	Susceptible Resistant	75	22 24	3 2	2 2	0 0	0 0	0.567 0.391	0.013 0.010	0.007 0.007	0.961 0.783	1.136	0.233
	SD2-SD3	Susceptible Resistant	69	22 24	3 2	2 1	1 0	0 0	0.558 0.391	0.009 0.006	0.008 0.004	0.610 0.391	0.568	0.119
	SD3	Susceptible Resistant	268	22 24	3 2	12 8	4 0	1 0	0.541 0.391	0.016 0.012	0.012 0.008	4.264 3.130	4.705	0.214
	SD3-SD4	Susceptible Resistant	77	22 24	2 2	3 3	0 0	2 1	0.485 0.391	0.019 0.015	0.011 0.010	1.455 1.174	1.705	0.229
	SD4	Susceptible Resistant	279	22 24	4 2	18 14	4 0	0 0	0.571 0.391	0.026 0.020	0.018 0.013	7.273 5.478	8.080	0.211
	SD4-SD5	Susceptible Resistant	69	22 24	3 2	6 5	1 0	0 0	0.541 0.391	0.038 0.028	0.024 0.019	2.602 1.957	2.795	0.185
	SD5	Susceptible Resistant	246	10 22	4 4	17 14	1 0	1 1	0.733 0.398	0.034 0.020	0.024 0.016	8.422 5.039	8.164	0.176
	SD5-SD6	Susceptible Resistant	63	10 22	2 2	1 1	0 0	0 0	0.533 0.368	0.008 0.006	0.006 0.004	0.533 0.368	0.555	0.187
	SD6	Susceptible Resistant	279	10 22	2 2	15 15	0 0	1 1	0.533 0.368	0.029 0.020	0.019 0.015	8.000 5.519	8.318	0.187
	SUP6	Susceptible Resistant	42	10 22	2 2	1 1	0 0	0 0	0.533 0.368	0.013 0.009	0.008 0.007	0.533 0.368	0.555	0.187
Leucine aminopeptidase (LAP)		Susceptible Resistant	1657	22 24	12 5	29 6	0 0	9 2	0.900 0.688	0.006 0.001	0.005 0.001	10.069 2.025	8.909	0.321

N, number of alleles sampled; Hap, number of different haplotypes; S, number of segregating sites; Si, number of singletons; NS, number of non-synonymous mutations; Hd, haplotype diversity; π , nucleotide diversity (per site); w , Watterson's mutation parameter θ estimated from S (per site); k, average number of nucleotide differences within strain; K, average number of nucleotide differences between strains; F_{st} , genetic differentiation between strains.

* Some measures (e.g. S and NS) are different between the whole sequence and the total of all sequences because of a different number of sampled haplotypes.

two-fold change conservatively used as a significant threshold in expression studies [29].

Discussion

A MITE-based genome scan to search for candidate genes

The goal of this study was to identify genes conferring resistance to the bio-insecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) in an *Aedes aegypti* mosquito strain selected for several generations with a toxic leaf litter containing *Bti* spores. The genetic basis of *Bti* resistance is likely to be multigenic [19,20], and in *Ae. aegypti*, we listed as many as 160 serious candidates by virtue of their known function and/or proven association with *Bti* resistance in other species (e.g. [20,30,31]). As a result, we

chose to tackle this study by adopting a population genomics approach. The underlying idea was to examine many MITE-derived DArT markers scattered in the genome to get an accurate estimate of the overall background (i.e. neutral) genetic differentiation between the selected (*Bti*-resistant) and control (*Bti*-susceptible) strains. This in turn allowed detecting markers with an atypically high inter-strain genetic differentiation, and thus possibly linked to a gene under positive selection due to *Bti* resistance. Our genome scan revealed an overall high level of neutral genetic differentiation between the two strains (mean F_{st} = 0.556), which is not unexpected in the light of the history of the resistant strain, and especially of the bottleneck it experienced at generation 10

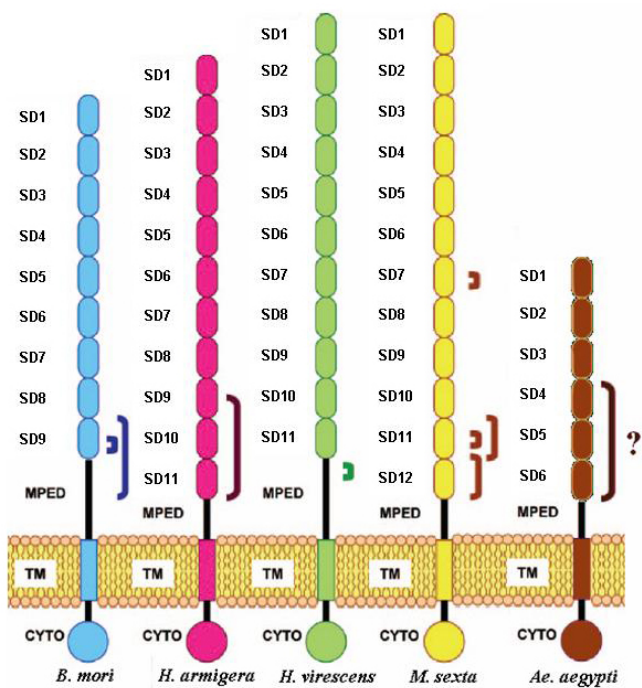


Figure 1
Comparison between lepidopteran cadherin-like proteins and the *Aedes aegypti* cadherin studied here.
 Cadherin-like proteins are constituted of different domains: SD, subdomain; MPED, membrane-proximal extracellular domain; TM, transmembrane domain; CYTO, cytoplasmic domain. Only features present in the mature form of the protein are outlined here. Known and putative Cry binding sites characterized in lepidopterans are indicated by parentheses. *B. mori*, *Bombyx mori*; *H. armigera*, *Helicoverpa armigera*; *H. virescens*, *Heliothis virescens*; *M. sexta*, *Manduca sexta*; *Ae. aegypti*, *Aedes aegypti*. Adapted from Figure 10 in [27].

(see Additional File 1). Yet, the *Fst* value obtained between the same two mosquito strains using AFLP markers is substantially lower (mean *Fst* = 0.114; Paris, pers. comm.). AFLP and DArT markers are biallelic, dominant and, to a certain extent, randomly distributed in the genome so they should provide similar genetic differentiation estimates. However, the DArT markers developed for the purpose of this study are intimately associated with a specific family of MITEs called *Pony*, whose characteristics might explain the discrepancy between the two *Fst* measures. *Pony* elements constitute about 1.1% of the genome of *Ae. aegypti* [25], and although their transposition mechanism is still unclear, it could be triggered by unfavorable environmental conditions as was shown for other MITEs in plants for example [24,32,33]. Several authors have even underlined the potential contribution of MITEs to rapid adaptations and, ultimately, genome evolution [24,34]. One can thus speculate that the environmental stress imposed by toxic leaf litter selection stimulated *Pony* transpositions, hence inflating estimates of inter-strain genetic differentiation as measured by our *Pony*-associated markers. Like many MITEs, *Pony* motifs are also known to frequently occur in the non-coding regions of genes [25]. Because of this last characteristic of *Pony* elements and of their high mutational potential possibly enhanced by stress, *Pony*-based DArTs are ideal random markers to explore the genome of *Ae. aegypti* and search for genes conferring resistance to *Bti*.

DArT marker sequences and identification of candidate genes

We decided to sequence the MITE-based DArT markers showing the highest inter-strain differentiation (outliers), as those are the most likely to be linked to genes conferring resistance to *Bti*. Of the 70 sequences obtained, 41 (68.6%) matched to unique locations in the genome of

Table 2: Results of the neutrality tests for the resistant strain

Neutrality test	Value	Significance according to coalescent simulations based on a large constant population size ^a	Significance according to coalescent simulations based on the known demographic history of the resistant strain ^b
Cadherin (CAD)			
Tajima's <i>D</i>	1.717	<i>p</i> < 0.01	n.s.
Fu and Li's <i>D</i> *	1.698	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.01
Fu and Li's <i>F</i> *	2.000	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.05
Fay and Wu's <i>H</i>	-50.370	<i>p</i> < 0.001	<i>p</i> < 0.01
Leucine aminopeptidase (LAP)			
Tajima's <i>D</i>	0.788	n.s.	n.s.
Fu and Li's <i>D</i> *	1.233	n.s.	n.s.
Fu and Li's <i>F</i> *	1.280	n.s.	n.s.
Fay and Wu's <i>H</i>	1.181	n.s.	n.s.

^a, performed following the method of Hudson [70] implemented in DnaSP; ^b, performed using the program ms [68].

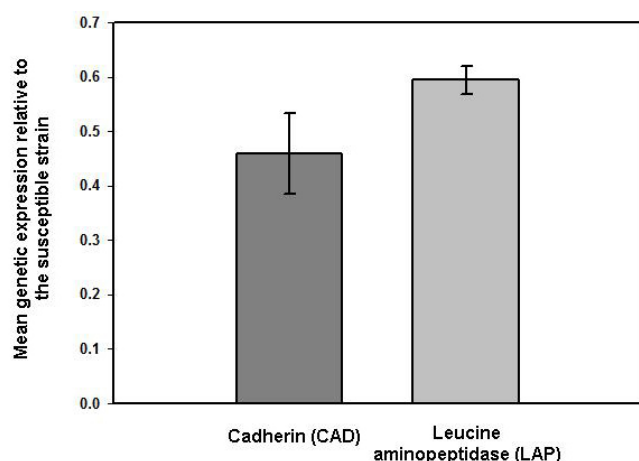


Figure 2
Results of the expression analyses for the two candidate genes. This figure illustrates, for each candidate gene, the mean gene expression in the resistant strain relative to that in the susceptible strain.

Ae. aegypti, while the rest consisted of repeated sequences. As less than 40% of the genome of this species is constituted of single or low copy sequences [35], this result confirms the fact that MITE-based DArTs tend to fall near low-copy, possibly coding, sequences. The 41 genomic locations involved were all but two situated on different supercontigs of the *Ae. aegypti* full genome sequence, suggesting that there was no real bias in the distribution of our markers in the genome, at least for highly differentiated ones. Unfortunately, the *Ae. aegypti* genome has a weak gene density [35], and most of our outlier sequences (85.4%) fell in supercontigs with few or no putative genes. Furthermore, we recently performed a differential transcriptome analysis of *Ae. aegypti* larvae exposed to different xenobiotics. This study, based on the sequencing of millions of cDNA tags using next-generation sequencing, detected more than 2000 loci situated outside predicted genes and showing a significant transcription signal (David, pers. comm.). There is thus an obvious need for a better gene annotation in the *Ae. aegypti* genome, and one efficient strategy to tackle this task would be to concentrate the effort on regions of interest, like those showing signatures of selection.

The selection with toxic leaf litter was a recent event in the history of the resistant strain so linkage disequilibrium is probably extensive in the vicinity of selected genes [36]. In those conditions, detecting selection signatures in a genome is somewhat easier even with a relatively small marker density [37], but on the other hand, the existence of large haplotype blocks makes it more difficult to pinpoint the exact gene(s) under selection. In this study, the distance between outlier markers and candidate genes was

considerable (between 100 and 3,000 Kb) and might exceed the window of linkage disequilibrium around selected genes. In other words, we might have overlooked closer genes genuinely responsible for the signatures of selection, but not already annotated or absent from our list of candidates.

The cadherin and leucine aminopeptidase as candidate genes

Among the five candidate genes discovered in the proximity of outlier markers, we decided to examine further the cadherin (CAD) and leucine aminopeptidase (LAP) at the sequence and expression levels, to confirm or infirm the selection footprint. This step was all the more crucial since selection but also particular demographic histories can generate an atypically high genetic differentiation [38,39].

Neutrality tests are often used to verify the influence of selection in intraspecific sequence data [40,41]. However, they have often been criticized for their lack of power and their sensitivity to demographic events like bottlenecks or population expansions which can mimic selective effects [38,42]. In this study, this possible bias was overcome by performing tailor-made coalescence simulations based on the known demographic history of the resistant strain, in order to assess the significance of the tests. No firm evidence of selection was found at the nucleotide or expression level for the LAP gene, which rules out its implication in *Bti* resistance, at least as a gene with major effects. For the CAD gene, Fu and Li's D^* and F^* tests highlighted a deficit in rare mutations, which is usually the trademark of balancing selection [43]. Fay and Wu's H statistics indicated an excess of high compared to intermediate frequency mutations, which on the contrary suggests the spread of an advantageous mutation at a linked site (i.e. positive selection) [44]. Although those conflicting results might be hard to interpret at first glance, one has to keep in mind that the selection with the toxic leaf litter started only 20 generations ago. In addition, the resistant strain experienced a recent bottleneck which probably further eliminated low frequency variants. New mutations certainly have not had time yet to appear in the population, which would explain the positive D^* and F^* values. For the same reason, Tajima's D can be transiently positive right after a bottleneck [45]. As for the H statistics, it is not as sensitive to the loss of rare variants, so it is presumably more reliable here and we can reasonably think that the CAD gene shows genuine signs of positive selection. This evidence is further reinforced by the significant under-expression of this gene in the resistant strain. Cadherins are indeed known to bind to Cry toxins in other insect species [27] and to be involved in many cases of Cry resistance in insects (e.g. [46-48]). Here, under-expression of the cadherin gene could reduce the number of a certain type of Cry receptors and thus hinder pore forming, ulti-

mately limiting susceptibility to *Bti*. Similarly, resistance to the toxin Cry1Ac has been shown to be linked to reduced levels of membrane receptors in the cotton pest *Heliothis virescens* [49], or in the cabbage moth *Plutella xylostella* [50]. Nevertheless, cadherins are usually specific to one particular Cry toxin [27], and it is unlikely that the CAD gene alone is responsible for resistance to *Bti* which is a mixture of several Cry toxins. One can thus hypothesize that this gene's effects supplement those of one or several other genes that remain to be identified.

Conclusion

Beyond their implications for the understanding of the genetic mechanisms of *Bti* mosquito resistance, these results illustrate how genome scans can build on the body of new genomic information (here, full genome sequence and MITE characterization) to finally hold their promises and help pinpoint candidate genes for adaptation and speciation [10]. In the near future, a wealth of genomics tools will be available for a much wider range of species, mostly thanks to the rapid development of next-generation sequencing technologies [51]. We predict this new knowledge will boost in many respects the use of population genomics for the study of the genetic bases of adaptation and speciation. Several limitations of current genome scans will certainly be soon overcome, with for example (1) the development of new genetic markers allowing screening the genome more finely (e.g. [52]) or specifically targeting coding regions (e.g. [53]); (2) an easier access to outlier sequences as well as full genomic sequences serving as references to locate outlier loci and identify nearby candidate genes; and (3) a better gene annotation. In short, population genomics will at last have the means to meet our expectations when it comes to identify genes under natural or artificial selection.

Methods

Biological material

Two *Aedes aegypti* laboratory strains were compared for the purpose of this study: the Bora Bora reference strain, known to be susceptible to most insecticides, and a strain artificially selected for resistance to a decomposed tree leaf litter showing a high toxicity for mosquito larvae. This leaf litter had been collected in a mosquito pond in Eastern France three months after treatment for mosquito control, and has been proved to contain *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) spores from commercial origin [54]. The use of this *Bti*-contaminated leaf litter in the selection experiments allowed mimicking the evolution of resistance to *Bti* in a situation close to field conditions. The susceptible and resistant strains were separated by 18 generations of selection (and by 20 generations in total), with a strong bottleneck at generation 10 (see Additional File 1 for more details on the demographic history of the resistant strain). The selection experiment and the bio-

assays implemented to monitor the evolution of resistance are described in [55]. At each generation, the lethal dose for 50% of the individuals after a 24 h-exposure (24 h-LD50) was determined for each strain using the Probit software [56]. After 18 generations of selection, the resistance ratios RR of the resistant strain (i.e., the ratio between the 24 h-LD50 values for the resistant and the susceptible strains, respectively) were 3.4-fold, 30.2-fold, 13.7-fold, 6.3-fold and 3-fold for the toxic leaf litter, Cry4A, Cry4B, Cry11A and Cyt1A toxins, respectively.

DNA extraction and genome scan

The genomic DNA used for all subsequent molecular work was extracted from fresh fourth-instar mosquito larvae using the Qiagen DNeasy Tissue Kit and protocol (Qiagen). Prior to extraction, the larvae midgut was removed carefully to avoid bacterial contamination.

The classical protocol of the Diversity Array Technology (DArT) [57] was slightly modified so as to provide hundreds of good-quality markers scattered in the genome of *Ae. aegypti* and possibly associated to gene-rich regions [55]. Briefly, in a first step, genomic DNA was digested with restriction enzyme Bsp1286I and a specific adaptor was ligated to compatible ends. Restriction fragments including a particular *Ae. aegypti* MITE called *Pony* were PCR-amplified using a primer annealing to the adaptor sequence and a primer complementary to a conserved motif of the *Pony* element. PCR products obtained for all individuals of the two strains were pooled together and cloned to construct a DArT library containing a total of 6144 MITE-based clones. In a second step, a labelled target produced for each *Ae. aegypti* individual as described in the first step was hybridized to the library fragments spotted on a glass slide in order to reveal the polymorphic ones. Details of the protocol, in particular the adaptor and primer sequences used and the reproducibility rates, can be found in [55].

Identification and sequencing of outlier loci potentially under selection

For each DArT marker obtained, allelic frequencies were estimated with the Bayesian method with non-uniform prior distribution [58] implemented in AFLP-SURV 1.0 [59]. Among those markers, we tracked those for which alternative phenotypes (fragment presence/absence) were fixed or nearly fixed in the two strains (for example, fragment present/absent for all individuals or all individuals except one). Our assumption was that such a pattern of extreme inter-strain genetic differentiation could be explained by the spread, in the resistant strain, of an advantageous allele initially present at low or intermediate frequency in the susceptible strain (standing variation), from which it is eventually purged by genetic drift and/or because it is slightly deleterious.

For 70 such markers, bacterial cultures were sent to Genome Express® <http://www.genome-express.com> for insert amplification and sequencing with M13 forward and M13 reverse primers. Raw sequence files were edited with BioEdit 7.0.9 [60] and purged from *Pony* and primer sequences. The obtained sequenced were blasted against the full genomic sequence of *Ae. aegypti* (consisting of 4758 supercontigs and available at <http://aaegypti.vectorbase.org/GetData/Downloads?type=Genome>).

Identification of candidate genes

Although mechanisms of resistance to *Bti* are still unknown in dipterans, resistances to several Cry toxins have been intensively studied, especially in lepidopteran pests resistant to transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry toxins genes [20,30]. Because these toxins share similar three-dimensional structures, similar modes of action and resistance mechanisms can be expected between lepidopteran and dipteran insects [16,61]. We therefore considered as candidate genes for *Bti* resistance those belonging to families previously proved to be involved in Cry resistance [20,30,31]. To this list, we added genes potentially implicated in activation of *Bti* toxins (aminopeptidases, e.g. [28]; and trypsins and chymotrypsins, e.g. [62]), in toxin binding (alkaline phosphatases, e.g. [49,63]; aminopeptidases, e.g. [64]; cadherins, e.g. [48]; galactosidases and glycosyltransferases, e.g. [20,65]); or immune defense (mitogen-activated protein kinases, e.g. [31]). A keyword search was conducted in the VectorBase database <http://aaegypti.vectorbase.org/index.php> and a total of 160 candidates located on 98 different supercontigs were identified out of the 15,419 putative genes (16789 transcripts in total) referenced in the *Aedes aegypti* genome.

Cadherin (CAD) and leucine aminopeptidase (LAP) gene sequencing

The complete genomic sequences of the CAD and LAP genes (VectorBase Gene IDs AAEL001196 and AAEL001649, respectively) were downloaded from the VectorBase website to help design sequencing primers (Additional file 4) with the software package Lasergene 7.2 (DNASTAR Inc.). The sequencing strategy for the CAD gene targeted exon 5 and more specifically the membrane-proximal subdomains (subdomains 4 to 6) of the protein which are the preferential binding sites of *Bti* Cry toxins in lepidopterans (Figure 1). For the LAP gene, three different primer pairs were selected to amplify the two main exons.

PCR amplifications were conducted for each gene in a 25- μ l total volume with 2 mM MgCl₂, 0.1 mM of each dNTP (Roche), 0.2 μ M of each primer, 5 μ g of BSA, 0.6 U of AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) and 10-30 ng of DNA. The PCR program included an initial 10-min denaturation step at 95°C; 40 cycles of dena-

turation at 95°C for 45s, annealing at the optimal temperature indicated in Additional file 4 for 45s and elongation at 72°C for 60s; followed by a final extension step at 72°C for 5 min. PCR products were purified with the QIAquick PCR purification kit (Qiagen) and sequencing reactions were performed in both directions using the amplification primers and the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit 3.1 (Applied Biosystems), following the manufacturer's indications. Fluorescently labelled sequencing products were run on an ABI PRISM 3100 capillary DNA sequencer (Applied Biosystems) and sequences were analyzed with SeqMan Pro 7.1.0 (DNASTAR Inc.). Overall, we obtained sequences for 11 and 12 individuals of the susceptible and resistant strains, respectively.

Sequence analysis and neutrality tests

The software DnaSP 5.0 [66] was used to infer haplotype phase and to assess a variety of genetic diversity and differentiation parameters (e.g., nucleotide diversity p , haplotype diversity Hd , number of segregating sites S , Fst , etc.) for each gene. Several statistics were also calculated based on the observed polymorphism data to test for deviation from neutral evolution in the resistant strain, including Tajima's D [67], Fu and Li's D^* and F^* [43], and Fay and Wu's H [44]. To assess whether these statistics significantly departed from a neutral scenario of evolution given the known demographic history of the resistant strain, we performed coalescent simulations using the program ms [68]. This program generates random independent samples according to a Wright-Fisher neutral model allowing population size changes in the past. For each gene, the mutation rate μ was estimated from the per-locus mutation parameter θ observed for the susceptible strain ($\theta = 4N_e\mu$ and $N_e = 6000$) and used as the starting value for the simulations (that is, as the value at present). Then 1000 neutral samples consisting of 24 haplotypes were simulated based on the known demographic history of the resistant strain (Additional file 1).

RNA extraction and gene expression analyses

For the two candidate genes, real-time reverse-transcription PCR (RT-PCR) analyses were performed on three biological replicates for each strain, with each replicate consisting of 30 larvae reared in standard insectary conditions up to the fourth-instar stage (5 days). Total RNAs were extracted using TRIzol (Invitrogen) following the manufacturer's instructions and their quality was assessed with a 2100 Bioanalyzer (Agilent) after DNase I (Invitrogen) treatment. Four micrograms of total RNA were digested with DNase I (Invitrogen) and then used for first-strand cDNA synthesis with SuperScript III (Invitrogen) reverse transcriptase and oligo-dT₂₀ primers for 60 min at 50°C, according to the manufacturer's instructions. Real-time RT-PCR reactions were performed on an iQ5 system

(Bio-Rad) in a 25- μ L total reaction volume with 0.3 μ M of each primer, 12.5 μ L of iQ SYBR Green supermix (Bio-Rad) and 5 μ L of cDNA diluted 25 times. The real-time RT-PCR program included an initial 3-min denaturation step at 95°C and 40 cycles of denaturation at 95°C for 15s and annealing for 30s at the optimal temperature indicated in Additional file 4. For each gene, real-time RT-PCR efficiency was estimated from a serial dilution of cDNA (5 to 500 times) and taken into account in the data analysis performed with the $\Delta\Delta C_T$ method [69]. Two housekeeping genes encoding ribosomal protein L8 (*RPL8*, GenBank accession number: [DQ440262](#)) and S7 (*RPS7*, GenBank accession number: [AY380336](#)) were used for normalization. Results were represented as mean expression ratios between *Bti*-resistant and susceptible larvae (\pm SE).

Abbreviations

Bti: *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*; CAD: cadherin; DArT: Diversity Arrays Technology; LAP: leucine aminopeptidase; MITE: miniature inverted-repeat transposable element; RT-PCR: reverse-transcription PCR.

Authors' contributions

AB carried out the genome scan, analyzed the candidate gene sequence data and drafted the manuscript. MP worked on the outlier sequences, identified the two candidate genes, helped with the analyses and wrote substantial parts of the paper. GT obtained and analyzed the candidate gene sequence and expression data and was involved in the writing. JPD supervised the gene expression study and helped draft the manuscript. LD conceived the overall study, performed the demographic simulations and took part to the data analysis and to the writing. All authors read and approved the final manuscript.

Additional material

Additional file 1

Demographic history of the Aedes aegypti Bti-resistant strain. The Bti-resistant strain was originally selected from the susceptible standard Bora-Bora strain. This table presents the effective population size at each generation of selection.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-551-S1.DOC>]

Additional file 2

Results of the Dfdist analysis with $\theta = 1\%$. In this plot of inter-strain Fst values against heterozygosity estimates, each dot represents a DArT marker. The red lines represent the 99% neutral confidence interval simulated using the program Dfdist [26]. Markers situated outside this interval diverge from neutral expectations and are thus potentially under selection. Here, the confidence interval is so large that it includes almost the entire range of possible Fst values.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-551-S2.DOC>]

Additional file 3

Outlier markers with a unique localization in the genome of Aedes aegypti. This table lists the 41 outlier markers with a unique localization in the genome of Aedes aegypti, as well as the numbers of annotated genes and candidate genes in the corresponding supercontigs.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-551-S3.DOC>]

Additional file 4

Primer pairs used for sequencing and real-time RT-PCR analyses. This table details the different primer pairs used in this study.

Click here for file

[<http://www.biomedcentral.com/content/supplementary/1471-2164-10-551-S4.DOC>]

Acknowledgements

The authors would like to thank Sébastien Boyer for help with the insecticide selection and Andrzej Kilian for guidance on the DArT technique. AB and LD were funded by the Région Rhône-Alpes (grants #0501553401 and #0501545401, respectively) and MP, JPD and LD benefited from a collaborative grant attributed by the Démoustication Rhône-Alpes. GT was supported by the French Ministry of Research.

References

1. Bonin A, Taberlet P, Miaud C, Pompanon F: **Explorative genome scan to detect candidate loci for adaptation along a gradient of altitude in the common frog (*Rana temporaria*).** *Mol Biol Evol* 2006, **23**:773-783.
2. Meyer CL, Vitalis R, Saumitou-Laprade P, Castric V: **Genomic pattern of adaptive divergence in *Arabidopsis halleri*, a model species for tolerance to heavy metal.** *Mol Ecol* 2009, **18**:2050-2062.
3. Savolainen V, Anstett MC, Lexer C, Hutton I, Clarkson JJ, Norup MV, Powell MP, Springate D, Salamin N, Baker WJ: **Sympatric speciation in palms on an oceanic island.** *Nature* 2006, **441**:210-213.
4. Nosil P, Egan SP, Funk DJ: **Heterogeneous genomic differentiation between walking-stick ecotypes: "Isolation by adaptation" and multiple roles for divergent selection.** *Evolution* 2008, **62**:316-336.
5. Emelianov I, Marec F, Mallet J: **Genomic evidence for divergence with gene flow in host races of the larch budmoth.** *P Roy Soc B-Biol Sci* 2004, **271**:97-105.
6. Campbell D, Bernatchez L: **Generic scan using AFLP markers as a means to assess the role of directional selection in the divergence of sympatric whitefish ecotypes.** *Mol Biol Evol* 2004, **21**:945-956.
7. Galindo J, Morán P, Rolán-Alvarez E: **Comparing geographical genetic differentiation between candidate and noncandidate loci for adaptation strengthens support for parallel ecological divergence in the marine snail *Littorina saxatilis*.** *Molecular Ecology* 2009, **18**:919-930.
8. Jump AS, Hunt JM, Martínez-Izquierdo JA, Peñuelas J: **Natural selection and climate change: temperature-linked spatial and temporal trends in gene frequency in *Fagus sylvatica*.** *Mol Ecol* 2006, **15**:3469-3480.
9. Meador BA, Hild AL: **Potential selection in native grass populations by exotic invasion.** *Mol Ecol* 2006, **15**:2291-2300.
10. Bonin A: **Population genomics: a new generation of genome scans to bridge the gap with functional genomics.** *Mol Ecol* 2008, **17**:3583-3584.
11. Stinchcombe JR, Hoekstra HE: **Combining population genomics and quantitative genetics: finding the genes underlying ecologically important traits.** *Heredity* 2008, **100**:158-170.
12. Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P: **The power and promise of population genomics: from genotyping to genome typing.** *Nat Rev Genet* 2003, **4**:981-994.

13. Wood HM, Grahame JW, Humphray S, Rogers J, Butlin RK: **Sequence differentiation in regions identified by a genome scan for local adaptation.** *Mol Ecol* 2008, **17**:3123-3135.
14. Lacey LA: *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *J Am Mosq Control Assoc* 2007, **23**:133-163.
15. Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, Zeigler DR, Dean DH: *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol Mol Biol Rev* 1998, **62**:775-806.
16. Bravo A, Gill SS, Soberón M: **Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control.** *Toxicon* 2007, **49**:423-435.
17. Pérez C, Fernandez LE, Sun JG, Folch JL, Gill SS, Soberón M, Bravo A: *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* CytIIAa synergizes CryIIAa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005, **102**:18303-18308.
18. Poncet S, Delecluse A, Klier A, Rapoport G: **Evaluation of synergistic interactions among the CryIVa, CryIVb, and CryIVd toxic components of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals.** *J Invertebr Pathol* 1995, **66**:131-135.
19. Georgioui GP, Wirth MC: **Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae).** *Appl Environ Microbiol* 1997, **63**:1095-1101.
20. Griffiths JS, Aroian RV: **Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins.** *Bioessays* 2005, **27**:614-624.
21. Boyer S, Tilquin M, Ravel P: **Differential sensitivity to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and temephos in field mosquito populations of *Ochlerotatus cataphylla* (Diptera: Culicidae): toward resistance?** *Environ Toxicol Chem* 2007, **26**:157-162.
22. Paul A, Harrington LC, Zhang L, Scott JG: **Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York.** *J Am Mosq Control Assoc* 2005, **21**:305-309.
23. Saleh MS, El-Meniawi FA, Kelada NL, Zahran HM: **Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*.** *J Appl Entomol* 2003, **127**:29-32.
24. Casacuberta JM, Santiago N: **Plant LTR-retrotransposons and MITEs: control of transposition and impact on the evolution of plant genes and genomes.** *Gene* 2003, **311**:1-11.
25. Tu ZJ: **Molecular and evolutionary analysis of two divergent subfamilies of a novel miniature inverted repeat transposable element in the yellow fever mosquito, *Aedes aegypti*.** *Mol Biol Evol* 2000, **17**:1313-1325.
26. Beaumont MA, Nichols RA: **Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure.** *P Roy Soc B-Biol Sci* 1996, **263**:1619-1626.
27. Pigott CR, Ellar DJ: **Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity.** *Microbiol Mol Biol Rev* 2007, **71**:255-281.
28. Matsui M, Fowler JH, Walling LL: **Leucine aminopeptidases: diversity in structure and function.** *Biol Chem* 2006, **387**:1535-1544.
29. Shi LM, Jones WVD, Jensen RV, Harris SC, Perkins RG, Goodsaid FM, Guo L, Croner LJ, Boysen C, Fang H, et al.: **The balance of reproducibility, sensitivity, and specificity of lists of differentially expressed genes in microarray studies.** *BMC Bioinformatics* 2008, **9**(Suppl 9):10.
30. Ferré J, Van Rie J: **Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*.** *Annu Rev Entomol* 2002, **47**:501-533.
31. Huffman DL, Abrami L, Sasik R, Corbell J, Goot FG van der, Aroian RV: **Mitogen-activated protein kinase pathways defends against bacterial pore-forming toxins.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:10995-11000.
32. Barret P, Brinkman M, Beckert M: **A sequence related to rice *Pong* transposable element displays transcriptional activation by *in vitro* culture and reveals somaclonal variations in maize.** *Genome* 2006, **49**:1399-1407.
33. Kikuchi K, Terauchi K, Wada M, Hirano HY: **The plant MITE *mPing* is mobilized in another culture.** *Nature* 2003, **421**:167-170.
34. Benjak A, Boué S, Forneck A, Casacuberta JM: **Recent amplification and impact of MITEs on the genome of grapevine (*Vitis vinifera* L.).** *Genome Biol Evol* 2009, **2009**:75-84.
35. Nene V, Wortman JR, Lawson D, Haas B, Kodira C, Tu ZJ, Loftus B, Xi ZY, Megy K, Grabherr M, et al.: **Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector.** *Science* 2007, **316**:1718-1723.
36. Przeworski M: **The signature of positive selection at randomly chosen loci.** *Genetics* 2002, **160**:1179-1189.
37. Storz JF: **Using genome scans of DNA polymorphism to infer adaptive population divergence.** *Mol Ecol* 2005, **14**:671-688.
38. Nielsen R: **Molecular signatures of natural selection.** *Annu Rev Genet* 2005, **39**:197-218.
39. Akey JM, Eberle MA, Rieder MJ, Carlson CS, Shriver MD, Nickerson DA, Kruglyak L: **Population history and natural selection shape patterns of genetic variation in 132 genes.** *PLoS Biol* 2004, **2**:1591-1599.
40. Ford MJ: **Applications of selective neutrality tests to molecular ecology.** *Mol Ecol* 2002, **11**:1245-1262.
41. Otto SP: **Detecting the form of selection from DNA sequence data.** *Trends Genet* 2000, **16**:526-529.
42. Depaulis F, Mousset S, Veuille M: **Power of neutrality tests to detect bottlenecks and hitchhiking.** *J Mol Evol* 2003, **57**(Suppl 1):190-200.
43. Fu YX, Li WH: **Statistical tests of neutrality of mutations.** *Genetics* 1993, **133**:693-709.
44. Fay JC, Wu CI: **Hitchhiking under positive Darwinian selection.** *Genetics* 2000, **155**:1405-1413.
45. Fay JC, Wu CI: **A human population bottleneck can account for the discordance between patterns of mitochondrial versus nuclear DNA variation.** *Mol Biol Evol* 1999, **16**:1003-1005.
46. Bel Y, Siqueira HAA, Siegfried BD, Ferré J, Escriche B: **Variability in the cadherin gene in an *Ostrinia nubilalis* strain selected for CryIAb resistance.** *Insect Biochem Mol Biol* 2009, **39**:218-223.
47. Gahan LJ, Gould F, Heckel DG: **Identification of a gene associated with Bt resistance in *Heliothis virescens*.** *Science* 2001, **293**:857-860.
48. Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, Shriver L, Ellers-Kirk C, Higginson D, Holley D, Gahan LJ, Heckel DG, Carriere Y, et al.: **Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, **100**:5004-5009.
49. Jurat-Fuentes JL, Adang MJ: **Characterization of a CryIAb-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae.** *Eur J Biochem* 2004, **271**:3127-3135.
50. Kumaraswami NS, Maruyama T, Kurabe S, Kishimoto T, Mitsui T, Hori H: **Lipids of brush border membrane vesicles (BBMV) from *Plutella xylostella* resistant and susceptible to CryIAb d-endotoxin of *Bacillus thuringiensis*.** *Comp Biochem Physiol B-Biochem Mol Biol* 2001, **129**:173-183.
51. Rokas A, Abbot P: **Harnessing genomics for evolutionary insights.** *Trends Ecol Evol* 2009, **24**:192-200.
52. van Orsouw NJ, Hogers RCJ, Janssen A, Yalcin F, Snoeijers S, Verstege E, Schneiders H, Poel H van der, van Oeveren J, Versteegen H, van Eijk MJT: **Complexity reduction of polymorphic sequences (CROPS): a novel approach for large-scale polymorphism discovery in complex genomes.** *PLoS ONE* 2007, **2**:e1172.
53. Namroud MC, Beaulieu J, Juge N, Laroche J, Bousquet J: **Scanning the genome for gene single nucleotide polymorphisms involved in adaptive population differentiation in white spruce.** *Mol Ecol* 2008, **17**:3599-3613.
54. Tilquin M, Paris M, Reynaud S, Despres L, Ravel P, Geremia RA, Gury J: **Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) in mosquito natural habitats.** *PLoS ONE* 2008, **3**:e3432.
55. Bonin A, Paris M, Després L, Tetreau G, David JP, Kilian A: **A MITE-based genotyping method to reveal hundreds of DNA polymorphisms in an animal genome after a few generations of artificial selection.** *BMC Genomics* 2008, **9**:459.
56. Raymond M, Prato G, Ratsira D: **Probability analysis of mortality assays displaying quantal response, version 3.3.** Praxeme, Saint-Georges d'Orques, France; 1995.
57. Wenzl P, Carling J, Kudrna D, Jaccoud D, Huttner E, Kleinbols A, Kilian A: **Diversity Arrays Technology (DART) for whole-genome profiling of barley.** *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, **101**:9915-9920.
58. Zhivotovsky LA: **Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers.** *Mol Ecol* 1999, **8**:907-913.
59. Vekemans X, Beauwens T, Lemaire M, Roldan-Ruiz I: **Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size.** *Mol Ecol* 2002, **11**:139-151.

60. Hall TA: **BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT.** *Nucl Acids Symp Ser* 1999, **41**:95-98.
61. de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N: **How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world.** *Trends Genet* 2001, **17**:193-199.
62. Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Johnson D, McGaughey WH: **Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins.** *J Biol Chem* 1997, **272**:23473-23476.
63. Fernandez LE, Aimanova KG, Gill SS, Bravo A, Soberón M: **A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of CryIIAa toxin in *Aedes aegypti* larvae.** *Biochem J* 2006, **394**:77-84.
64. Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH: **Identification of a *Bacillus thuringiensis* CryII Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*.** *BMC Biochem* 2006, **7**:16.
65. Griffiths JS, Huffman DL, Whitacre JL, Barrows BD, Marroquin LD, Muller R, Brown JR, Hennet T, Esko JD, Aroian RV: **Resistance to a bacterial toxin is mediated by removal of a conserved glycosylation pathway required for toxin-host interactions.** *J Biol Chem* 2003, **278**:45594-45602.
66. Librado P, Rozas J: **DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data.** *Bioinformatics* 2009, **25**:1451-2.
67. Tajima F: **Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism.** *Genetics* 1989, **123**:585-595.
68. Hudson RR: **Generating samples under a Wright-Fisher neutral model of genetic variation.** *Bioinformatics* 2002, **18**:337-338.
69. Pfaffl MW: **A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR.** *Nucleic Acids Res* 2001, **29**:e45.
70. Hudson RR: **Gene genealogies and the coalescent process.** *Oxf Surv Evol Biol* 1990, **7**:1-44.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



III- Comparaison de l'expression des gènes entre les souches résistante et sensible aux toxines du *Bti*

La résistance aux toxines du *Bti* peut impliquer des modifications des niveaux de transcription de nombreux gènes et entraîner :

- la baisse de la transcription des récepteurs des toxines du *Bti*,
- l'augmentation de l'activité de dégradation ou baisse de l'activité d'activation de ces toxines par les protéases du tube digestif,
- l'augmentation des activités de réparation cellulaire,
- l'augmentation des activités du système immunitaire.

Une analyse comparative du niveau d'expression constitutif des gènes de la souche d'*Aedes aegypti* sensible et de la souche résistante LiTOX peut permettre de mettre en évidence ces mécanismes de résistance aux toxines de *Bti*. Lors de ma thèse, j'ai tout d'abord utilisé la puce à ADN '*Aedes* Detox Chip' développée au Royaume Uni par Strode et al. 2007 afin d'étudier l'expression des gènes codant pour les enzymes de détoxification chez mes deux souches de moustique. Ensuite, j'ai utilisé une nouvelle technologie de séquençage à très haut débit (Solexa) pour étudier comparativement l'ensemble du transcriptome des ces deux souches.

III.1- Analyse comparative de l'expression des enzymes de détoxification

III.1.1- Mesure de l'expression des gènes codant pour des enzymes de détoxification

Plusieurs gènes codant pour des enzymes de détoxification sont localisés sur les même supercontigs que les *outliers* identifiés par scan génomique. Cinq monooxygénases à cytochrome P450 (AAEL001807, AAEL002633, AAEL002638, AAEL003380 et AAEL003399), 5 carboxylestérase (AAEL002367, AAEL002376, AAEL002378, AAEL002385 et AAEL002391) et 1 glutathion *S*-transférase (AAEL000092) sont localisés sur 4 des 41 supercontigs contenant un marqueur *outlier* DArT. De même, le supercontig 1.174 contenant le loci *outlier* AFLP 394 contient également 3 gènes codant pour des P450s : les gènes AAEL005775, AAEL005771 et AAEL005788.

L'implication de cytochromes P450 dans la résistance au *Bti* n'a encore jamais été démontrée. Cependant, chez le Lépidoptère *Choristoneura fumiferana*, une augmentation de l'expression de sept gènes codant pour des cytochromes P450 a été mise en évidence après une exposition sub-létale à la toxine Cry1A (van Munster et al. 2007). De plus, d'autres enzymes de détoxification comme les estérases peuvent être impliquées dans les mécanismes de réparation cellulaire ou de séquestration des toxines Cry, et augmenter ainsi la résistance au *Bt* (Gunning et al. 2005, Meunier et al. 2006). Il apparaît donc intéressant de vérifier si certains gènes codant pour des enzymes de détoxification (notamment ceux détectés par les *outliers*) sont sur-exprimés ou sous-exprimés chez la souche LiTOX résistante au *Bti*. Nous avons utilisé la **puce à ADN 'Aedes Detox Chip'** qui permet de mesurer chez *Ae. aegypti* des différences de niveaux de transcription entre deux échantillons pour 204 gènes de détoxification, incluant l'ensemble des gènes codant pour des monooxygénases à cytochrome P450, des glutathion *S*-transférases et des estérases. L'expression différentielle de chacun de ces 204 gènes et de 29 gènes de contrôle est mesurée quatre fois par puce (quatre spots d'ADN par gène). Les hybridations ont été effectuées au sein du laboratoire qui a développé cette puce, la « Tropical School of Medicine » à Liverpool (Royaume Uni).

Les extractions d'ARN ont été effectuées à partir de lots de 30 larves avec le Kit commercial « PicoPure™ RNA isolation » (Molecular Devices). Trois répliques biologiques ont été utilisés pour chacune des deux souches testées. Une étape de digestion par une DNase (RNase-free DNase Set, Qiagen) a permis d'éliminer l'ADN génomique encore présent dans les extraits d'ARN totaux. Les ARN messagers ont ensuite été amplifiés grâce à l'utilisation d'une T7-ARN polymérase à l'aide du Kit « RiboAmp™ RNA amplification » (Molecular Devices). A chaque étape, la quantité et la qualité des ARN ont été mesurées par microspectrophotométrie avec le NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies). Pour chaque hybridation, 8 µg d'ARN amplifiés sont rétrotranscrits en ADNc. Lors de cette étape, les ADNc de l'une des deux souches sont marqués avec un fluorophore vert (Cyanine3-dUTPs), tandis que l'ADNc de l'autre souche est marqué en rouge (Cyanine5-dUTPs). Les cDNA marqués des deux souches sont ensuite hybridés de manière compétitive sur une puce 'Aedes Detox Chip'. Pour chaque réplique biologique, deux hybridations ont été effectuées en intervertissant le fluorochrome entre les souches (« dye swap ») : un total de 6 hybridations effectué pour comparer les deux souches d'*Ae. aegypti* étudiées

L'obtention des données brutes a été effectuée grâce au logiciel Genepix 5.1 (Axon Instruments). Le principe est de mesurer la fluorescence émise pour chaque spot d'ADN présent sur la puce et pour chaque souche et de les superposer. On obtient alors une image composée de spots de couleur allant du vert (ADNc de la première condition est majoritaire) au rouge (ADNc de la deuxième condition est majoritaire) en passant par le jaune (les ADNc issus des deux conditions sont hybridés en quantité égale). La normalisation et l'analyse statistique a ensuite été effectuée à l'aide du logiciel Genespring 6.1 (Agilent Technologies). Pour chaque puce, les quatre répliqués de chaque gène ont été regroupés et l'expression différentielle entre les deux souches a été exprimée sous forme d'un rapport de niveau de transcription. La significativité des rapports obtenus pour chaque gène sur les 6 hybridations a été testée avec un test t de Student (avec correction multiple). Les gènes montrant un rapport de transcription supérieur à 2 (sur-exprimés au moins deux fois chez la souche LiTOX) ou inférieur à 0.5 (sous-exprimés au moins deux fois chez la souche LiTOX) et une *P*-value du test de Student inférieur à 0.01 après correction ont été considérés comme significatifs.

III.1.2- Résultats et interprétation

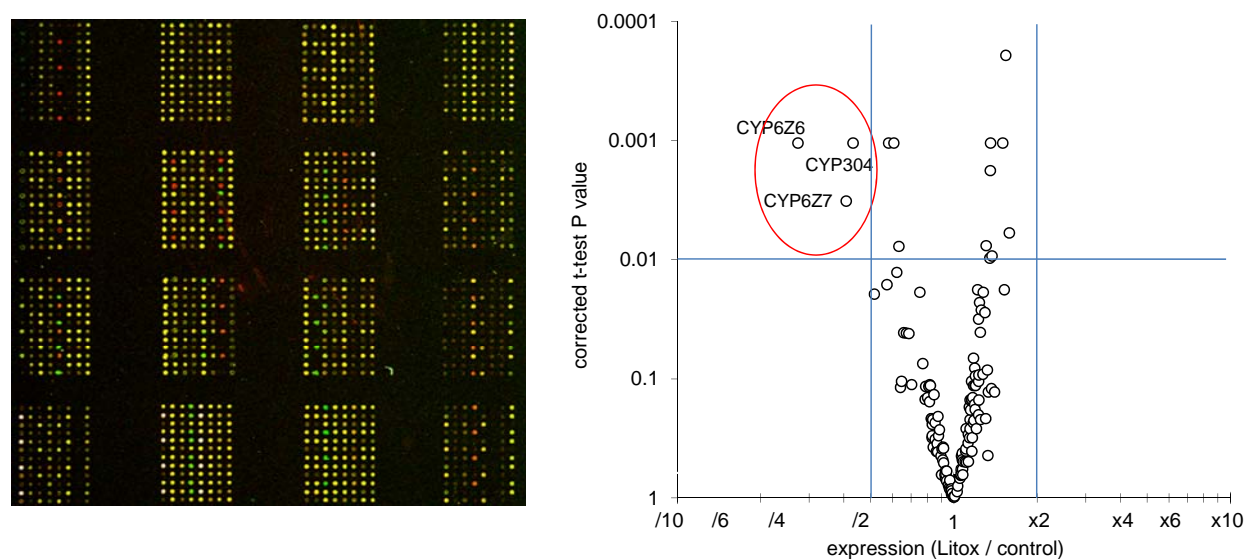


Figure 7 : Exemple d'une image de la puce « *Aedes Detox Chip* » obtenue lors de cette expérience (à gauche), et « Volcano-plot » indiquant le rapport de transcription et leur significativité obtenus pour les 144 gènes analysés (à droite). Les gènes significativement sous-exprimés sont entourés en rouge.

Au total 144 gènes sur 204 ont montré des niveaux de transcription suffisants pour leur analyse. Parmi eux, **aucun n'est sur-exprimé plus de deux fois chez la souche LiTOX** par rapport à la souche sensible. Trois gènes codant pour des P450s sont cependant

significativement sous-exprimés plus de deux fois chez la souche LiTOX : le gène *CYP6Z6* est sous-exprimé plus de 3 fois et demi, et les gènes *CYP6Z7* et *CYP304C1* sont sous-exprimés deux fois et demi environ (figure 7). Même si ils sont significatifs, ces rapports demeurent faibles. Malheureusement, les niveaux de transcription des trois gènes codant pour des P450 se trouvant sur le même supercontig que l'outlier AFLP 394 n'étaient pas suffisants pour qu'ils soient analysés et aucune donnée pour ces gènes n'a été obtenue avec cette méthode.

Globalement, ces résultats indiquent que la résistance de la souche LiTOX aux toxines de *Bti* ne semble pas liée à la surexpression d'enzymes de détoxification. Concernant la diminution des niveaux de transcription de certains P450s chez la souche LiTOX, il apparaît difficile de relier directement ce phénomène aux mécanismes de résistance connus ou attendus. Bien que cela reste à démontrer, il semble plus probable que cet effet soit du à la dérive génétique ou à des effets pléiotropes (compensation) liés à la résistance.

III.2- Analyse comparative de l'ensemble du transcriptome des souches sensible et résistante grâce au séquençage à très haut débit

III.2.1- Séquençage du transcriptome

Une analyse globale des variations des niveaux de transcription des gènes entre les deux souches (Sensible et LiTOX) a ensuite été réalisée grâce à la technologie de *Serial Gene Expression Analysis* (SAGE) couplée au séquençage à très haut débit Solexa (illumina). Pour chaque souche, l'ARN total a été extrait pour trois répliques de 30 larves avec le Kit PicoPure™ RNA isolation kit (Molecular Device). La quantité des ARN totaux a été mesurée par électrophorèse à capillaire grâce au Bioanalyzer 2100 (Agilent), puis, chaque échantillon a été dilué à 750 ng/μL. Les trois répliques biologiques ont ensuite été mélangés en proportion égale. Les bibliothèques de fragments de cDNA (tags) ont été préparés par la société Illumina en utilisant la méthode *Digital Gene Expression Tag Profiling* (DGETP, figure 8).

Une fois les ARN totaux rétrotranscrits en ADNc, la méthode DGETP consiste à digérer les ADNc avec l'enzyme *DpnII* qui reconnaît un site de restriction de 4 pb (GATC). Un adaptateur contenant un site de reconnaissance pour l'enzyme *MmeI* est ensuite ligué aux fragments de restriction. Enfin, l'enzyme de restriction *MmeI* est utilisée pour couper les

fragments de restriction contenant la queue de poly A 20 pb en 3' du site de reconnaissance contenu dans l'adaptateur. Cette méthode permet donc d'obtenir pour chaque transcrit possédant un site DpnII une séquence de 20 pb spécifique proche du site de polyadénylation (PolyA) entourée de deux adaptateurs connus. Ces séquences sont ensuite amplifiées par PCR, purifiées sur gel et séquencées grâce au séquenceur à très haut débit solexa (Illumina).

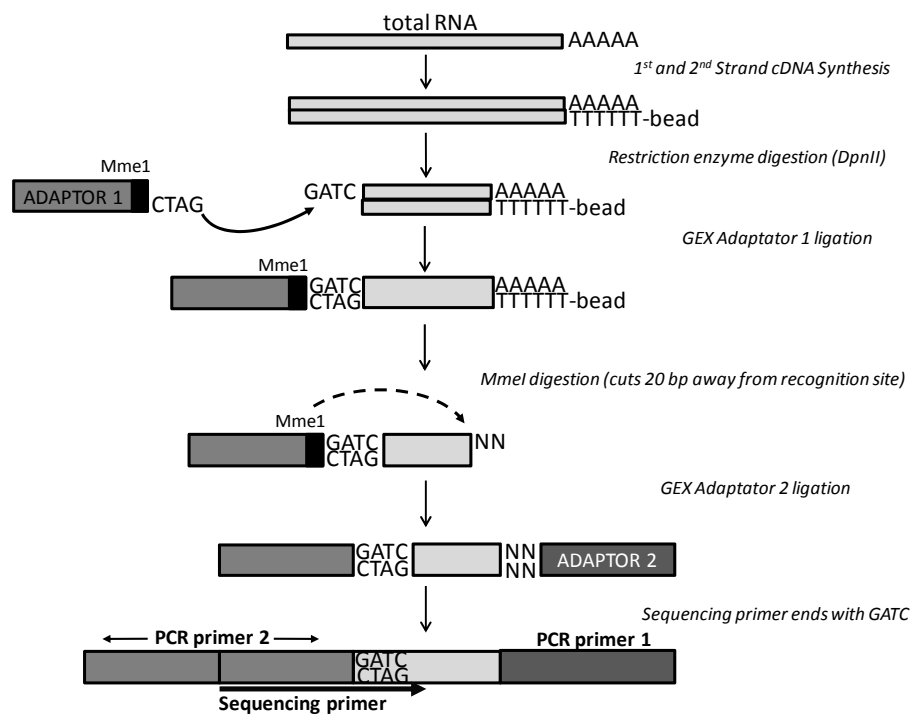


Figure 8 : Description de la méthode Digital Gene Expression Tag Profiling.

III.2.2- Analyse des résultats

Le tri des fragments d'ADNc, leur localisation sur le génome d'*Ae. aegypti* (mapping), le regroupement des fragments par gène connus ou par régions génomiques (clustering) et les analyses statistiques ont été effectués à l'aide d'une approche bio-informatique développée au laboratoire par Eric Coissac et Christelle Melodelima. La purification du jeu de donnée brute a consisté à ne conserver que les séquences de 20 pb détectées de manière significative (au moins 20 séquences sur l'ensemble des échantillons). Ces séquences ont ensuite été localisées sur le génome d'*Ae. aegypti* (disponible sur <http://www.ensembl.org>) grâce au logiciel TagMatcher développé au laboratoire. Ce logiciel permet la localisation de séquences, en permettant des erreurs entre les séquences et le génome de référence utilisé, et la reconnaissance de celles-ci à de multiples positions dans le génome. Seules les séquences

localisées à une position unique dans le génome et possédant 0 ou 1 erreur par rapport à la séquence de référence ont été conservées pour les analyses d'expression. Toutes les séquences localisées dans le même gène ont été ensuite regroupées et additionnées pour obtenir un nombre de séquence par gène et par souche testées. Les séquences qui étaient localisées dans des régions non annotées du génome ont été regroupées en clusters : un cluster comprend toutes les séquences localisées sur le même brin et distantes de moins de 500 pb.

Les rapports de transcription (LiTOX/sensible) pour chaque gène et chaque cluster ont été calculés après normalisation par le nombre total de séquences obtenues par souche, puis transformés en \log_{10} pour les analyses statistiques. La probabilité que le rapport de transcription soit différent de 1 a été calculée grâce à un test t de Fisher après corrections multiple de Holm. Les niveaux de transcription des gènes (ou clusters) ont été considérés significativement différents entre la souche LiTOX et la souche sensible lorsque les p values du test de Fisher étaient inférieures à 0.001 et les rapports d'expressions supérieurs 3 (sur-exprimés 3 fois chez la souche LiTOX) ou inférieurs à 0.33 (sous-exprimés 3 fois chez la souche LiTOX).

III.2.3- Résultats et interprétation

III.2.3.1- Analyse globale

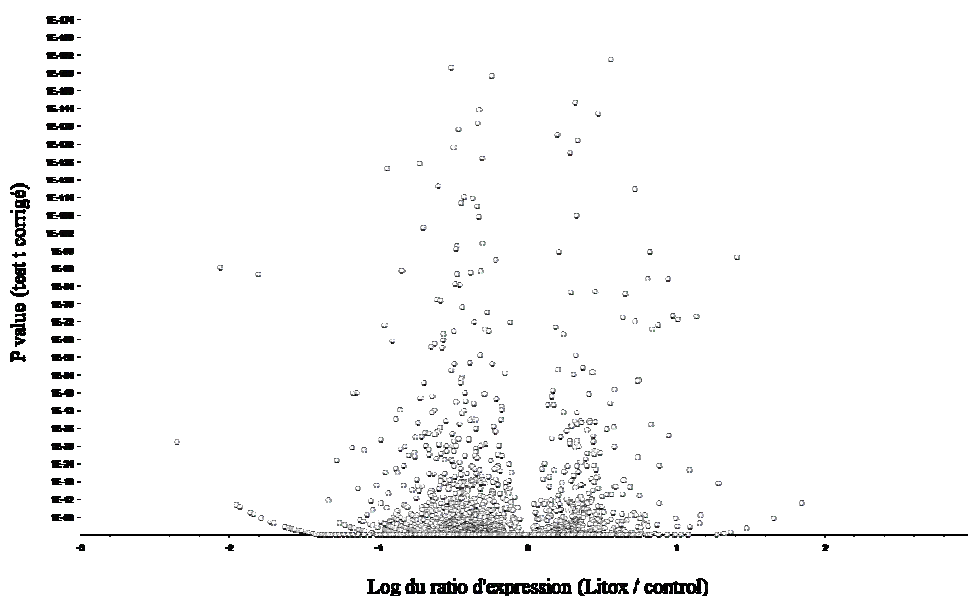
Au total, 4 347 110 séquences ont été obtenues pour la souche sensible et 2 250 845 pour la souche LiTOX (tableau 3). Ces séquences sont réparties en 12 877 régions génomiques (clusters). Parmi ces clusters, 7 965 (62 %) sont localisés dans **6 434 gènes annotés du génome d'*Ae. aegypti*** et 4 912 (38 %) sont localisés dans des régions du génome non annotées. Nos premières analyses montrent qu'une partie importante de ces fragments pourrait représenter des gènes non encore identifiés et annotés dans le génome, ou bien des ARN de régulation non codants.

Parmi les 6 434 gènes dont l'expression a été détectée (Figure 9), 843 (13 %) ont montré un niveau de transcription significativement différent entre les deux souches (p value < 0.001). Parmi ces gènes, 78 sont sur-exprimés plus de 3 fois et 254 sont sous-exprimés plus de 3 fois chez la souche LiTOX. Ces 332 gènes seront considérés comme ayant une expression différente entre la souche sensible et la souche LiTOX.

Tableau 3 : Nombre de séquences, de clusters et de gènes identifiés lors de l'analyse.

Séquences totales	sensible	4 347 110
	LiTOX	2 250 845
Séquences localisés sur le génome	sensible	2 063 118
	LiTOX	1 075 613
Séquences localisés dans les gènes	sensible	1 721 172
	LiTOX	916 135
Clusters	total	12 877
	diff. significative	1 291
	sur-exprimé	463
	sous-exprimé	828
Gènes	total	6 434
	diff. significative	843
	sur-exprimé	285
	sous-exprimé	558
Gènes significatifs et avec une différence d'expression de 3 fois ou plus	total	332
	sur-exprimé	78
	sous-exprimé	254
Gènes candidats	total	12
	sur-exprimé	2
	sous-exprimé	10

L'expression de ces gènes varie entre une sur-expression de 40 fois chez la souche LiTOX par rapport à la souche sensible et une sous-expression de 114 fois chez la souche LiTOX. Le niveau d'annotation actuel du génome d'*Ae. aegypti* n'a pas permis d'établir de fonction pour 109 de ces gènes (*Hypothetical conserved protein*).

**Figure 9 :** Distribution des ratios d'expression (exprimés en log) entre la souche LiTOX et la souche sensible, et de leur significativité.

III.2.3.2- Genes candidats

Les niveaux d'expression de 49 des 300 **gènes candidats** pouvant être potentiellement impliqués dans la résistance aux toxines du *Bti* ont ensuite été comparés entre la souche LiTOX et la souche sensible. Les gènes candidats non analysés représentent soit des gènes insuffisamment exprimés ou ne possédant pas de site *DpnII* et qui n'ont donc pas produit de séquences, soit des gènes appartenant à des familles multigéniques proches génétiquement et pour lesquels les séquences obtenues n'ont pas pu être localisées sans ambiguïté dans le génome d'*Ae. aegypti*. En effet, seul les fragments attribués à une seule localisation dans le génome ont été retenus pour les analyses (tableau 1).

Parmi les 49 gènes candidats analysés, 12 ont montré des différences de niveau de transcription significatives entre la souche sensible et la souche LiTOX (figure 10).

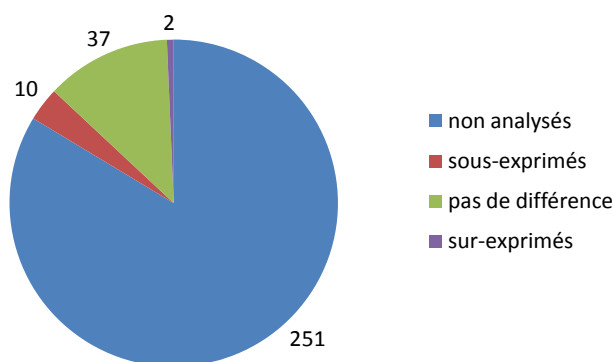


Figure 10 : Nombre de gènes candidats non analysés (en bleu), sous-exprimés chez la souche LiTOX (en rouge), sur-exprimés (en violet), et ne montrant pas de différence significative entre la souche sensible et la souche LiTOX en vert.

Deux gènes codant pour des trypsines (AAEL005603 et AAEL008097) apparaissent sur-exprimés 14 et 4 fois respectivement chez la souche LiTOX en comparaison de la souche sensible. De nombreuses sérines protéases comme les trypsines ou les chymotrypsines produites dans le tube digestif des larves d'insectes sont impliquées dans l'activation, mais aussi dans la dégradation des toxines du *Bt* (Pang & Gringorten 1998, Bah et al. 2004). Un gène codant pour un inhibiteur de sérines protéases (AAEL013933) est également sous-exprimé 5 fois chez la souche LiTOX. La sous-expression de certains inhibiteurs de protéases entraîne également une augmentation des activités protéasiques de dégradation et la résistance aux toxines du *Bt* (Shao et al. 1998). C'est le cas par exemple chez le Lépidoptère *Spodoptera littoralis*, où l'augmentation du niveau d'inhibiteurs de protéases induit une augmentation de l'activité de dégradation et à l'inactivation des toxines Cry1C (Keller et al. 1996).

Trois gènes codant pour des sérines protéases apparaissent aussi sous-exprimés chez la souche LiTOX : les gènes AAEL000074, AAEL000028 et AAEL010139 sous-exprimés 3, 4 et 6 fois respectivement. La famille des sérines protéases comprend entre autre des trypsines et des chymotrypsines, ces gènes peuvent donc être impliqués dans l'activation des toxines du *Bti*.

Trois gènes codant pour des aminopeptidases (AAEL009764, AAEL007892 et AAEL002978), un gène codant pour une alcaline phosphatase (AAEL003298), sont également sous-exprimés 3, 4, 4 et 5 fois respectivement chez la souche LiTOX. Les aminopeptidases et les alcalines phosphatases ont été décrites comme des récepteurs membranaires de nombreuses toxines du *Bt* chez les Lépidoptères et les moustiques (Fernandez et al. 2006, Abdullah *et al.* 2006, Bravo et al. 2007, Zhang et al. 2008). La diminution du nombre de récepteurs membranaires est un mécanisme de résistance aux toxines du *Bt* (Griffitts et al. 2005, Barrows et al. 2006). Par exemple, la diminution du nombre de phosphatases alcalines chez le Lépidoptère *Heliothis virescens* est directement corrélée avec la résistance à la toxine Cry1A (Jurat-Fuentes & Adang 2004).

Deux gènes codant pour des actines (AAEL001673 et AAEL005961) sont sous-exprimés 4 fois chez la souche LiTOX. La famille des actines sont des éléments intracellulaires impliqués notamment dans le maintien des microvillosités des cellules épithéliales. Même si leur rôle dans la toxicité des toxines Cry reste encore peu connu, les actines peuvent fixer la toxine CryIA chez *Heliothis virescens* (McNall & Adang 2003, Krishnamoorthy et al. 2006) et semblent impliquées dans l'activation des voies de mort cellulaire (Zhang et al. 2005). Une diminution d'expression de certains gènes codant pour des actines pourrait donc limiter les processus d'apoptose induits par les toxines Cry.

III.2.3.3- Autres gènes

Seulement quatre gènes codant pour des enzymes de détoxification (sur 107 gènes de détoxification détectés par cette méthode) montrent des différences de niveau de transcription entre les deux souches sensibles et LiTOX. Aucun de ces gènes n'est présent sur la puce à ADN « Aedes Detox Chip » précédemment utilisée. Deux gènes codant pour des P450s (AAEL009129 et AAEL014609) sont 6 fois sur-exprimés et sous-exprimés respectivement, et un gène codant pour une GST (AAEL006829) est sous-exprimé 21 fois. Les P450s et les GST jouent un rôle dans la dégradation de nombreux insecticides (Scott 1999, Ranson &

Hemingway 2005), cependant, leur implication dans la résistance aux toxines du *Bt* n'a jamais été mise en évidence. Ces différences d'expression pourraient être dues à des réponses au stress induit par la toxicité du *Bt*, à des effets épistatiques avec les gènes de résistance au *Bt* ou à la dérive génétique. Un gène codant pour une estérase (AAEL000904) semble aussi sur-exprimé environ 4 fois chez la souche LiTOX. Les estérases peuvent être impliquées dans la séquestration des toxines Cry ou dans des mécanismes de réparation cellulaire, une augmentation de leurs activités pouvant augmenter la résistance aux toxines Cry (Gunning et al. 2005, Meunier et al. 2006).

Une analyse plus fine des 320 gènes non identifiés comme candidats à la résistance aux toxines de *Bti* et montrant une différence d'expression entre la souche sensible et la souche LiTOX est en cours et ne sera pas présentée dans ce manuscrit. Tout d'abord, la fonction des gènes non connus dans le génome d'*Ae. aegypti* pourra être étudiée en recherchant des gènes orthologues chez d'autres organismes mieux annotés (par exemple avec le logiciel g:profiler (Reimand et al. 2007) disponible sur <http://biit.cs.ut.ee/gprofiler/welcome.cgi>). L'objectif est ensuite de grouper les gènes connus suivant leurs fonctions et de comparer les patterns de transcription de ces groupes fonctionnels entre les deux souches. Enfin, il sera intéressant de vérifier si la distribution dans le génome des gènes qui sont transcrits différemment entre les deux souches est aléatoire ou si ceux-ci sont regroupés dans certaines régions du génome.

Chapitre 4- Coût de la résistance aux toxines du *Bti*

I- Présentation de l'étude et principaux résultats

Le coût de la résistance est un facteur important pour la mise en place de stratégies de traitement limitant l'évolution de la résistance dans les populations naturelles. D'un point de vue adaptatif, les effets pléiotropes liés à la résistance représentent également un exemple de choix pour l'étude des compromis entre des caractères phénotypiques antagonistes. Ainsi, une analyse du coût de la résistance aux toxines du *Bti* exprimé dans la souche LiTOX a été effectuée par deux méthodes complémentaires (article 6 : Parsi et al., en préparation) :

- par comparaison de 14 traits phénotypiques et morphologiques entre la souche sensible et la souche LiTOX,
- par l'évaluation de la réduction du niveau de résistance de la souche LiTOX en absence de traitement pendant plusieurs générations.

Des coûts significatifs ont été observés chez la souche résistante LiTOX sur 5 des 14 traits phénotypiques comparés entre les deux souches. Ces traits sont répartis tout au long du cycle de vie du moustique. Les coûts les plus élevés concernent **la longévité des œufs**, avec une baisse de 69 % de la survie des œufs de la souche LiTOX par rapport à la souche sensible après 6 mois de stockage. Néanmoins, aucun coût sur la viabilité des œufs n'est observé lorsque ceux-ci sont conservés 2 semaines seulement. En régions tempérées, de nombreuses espèces de moustiques du genre *Aedes* résistent au froid sous forme d'œufs et aucune éclosion n'est observée durant les mois d'hiver. Une diminution significative de la survie des œufs des populations résistantes pourrait donc limiter l'évolution de la résistance d'une année sur l'autre. Dans les pays au climat chaud, les générations des moustiques du genre *Aedes* se succèdent souvent très rapidement, ne permettant probablement pas l'expression d'un coût important sur la longévité des œufs.

Cette étude a également révélé un **temps de développement larvaire** allongé de 18 % chez la souche LiTOX par rapport à la souche sensible. Le temps de développement larvaire est le facteur principal influant sur le temps intergénérationnel, et, chez les espèces en expansion c'est une des composantes principales de la valeur sélective. De plus, chez les

larves de moustiques évoluant dans des gîtes temporaires, un allongement du temps de développement augmente la probabilité d'assèchement des gîtes et de mort des larves.

Enfin, un fort coût sur la **fécondité des femelles** a été observé chez la souche LiTOX dont les femelles pondent 40 % moins d'œufs en moyenne que celles de la souche sensible. La fécondité est directement liée à la fitness des individus et semble particulièrement affectée par la résistance aux toxines Cry avec 69 % des études détectant un coût de la résistance sur ce trait phénotypique (Gassmann et al. 2009).

L'effet global des coûts sur l'évolution de la résistance a ensuite été mesuré chez la souche LiTOX maintenue pendant cinq générations sans sélection. Une **baisse spectaculaire de la résistance au *Bti*** a été observée lorsque la pression de sélection est absente, et un niveau de résistance comparable à la souche sensible témoin est atteint en seulement cinq générations. Au contraire, la résistance continue d'augmenter significativement lorsque la pression de sélection est maintenue chez la souche LiTOX.

La baisse de la **longévité des œufs** de la souche résistante peut affecter significativement l'évolution de la résistance en peu de générations, car, une importante baisse de résistance est visible en seulement une seule génération lorsque les œufs sont stockés quatre mois. Ce coût est particulièrement intéressant pour limiter l'évolution de la résistance dans les régions tempérées où les œufs sont stockés plusieurs mois en hivers.

La forte diminution de la résistance en absence de traitement est un facteur important pour l'application de stratégies de traitement comme les rotations ou la stratégie « haute dose refuge » qui permettent de limiter l'évolution rapide des résistances.

II- Contribution scientifique sous forme d'article

Article 6 : PARIS M, DAVID JP, DESPRES L. Resistance cost to *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* toxins in the dengue vector mosquito *Aedes aegypti*. En préparation

Chapitre 4 - Article 6

Fitness costs of resistance to *Bti* toxins in the dengue vector *Aedes aegypti*

PARIS M, DAVID JP, DESPRES L

En préparation

Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS-UMR 5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

Key words : resistance cost, insect resistance, *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*, Cry toxins, *Aedes aegypti*

Corresponding author: Margot Paris. Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS-UMR 5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France.

Tel: +33 4 76 63 56 99. Fax: +33 4 76 51 42 79.

Email: margotparisl@gmail.com

Running title: resistance cost to *Bti* toxins

ABSTRACT

Sustainable insect vector disease control strategies involve delaying the evolution of resistance to insecticides in natural populations. The evolutionary dynamics of resistance in the field is strongly dependent on the fitness cost of resistance alleles. Fitness costs of resistance occur when, in the absence of insecticide treatment, fitness is lower for resistant than for susceptible insects. To succeed in managing resistance evolution in target species, it is not only important to evidence fitness cost in resistant insects, but also to determine at which insect's life-stage it is expressed. Indeed, life-stage duration is likely to interfere with the climate, and fitness cost expression with the strategy adopted for treatments. Here we show that resistance costs to *Bti* toxins express at all life stages of the dengue vector *Aedes aegypti*, including egg survival, larval development time, and female fecundity. We show that the storage of eggs for four months is long enough to counter-select resistance alleles suggesting that *Bti* resistance is not likely to evolve in temperate climates where most mosquito species over-winter as eggs. In tropical regions with a rapid turn-over of generations, resistance alleles are counter-selected in only five generations without treatment through fitness costs expressed in terms of larval development time and female fecundity.

INTRODUCTION

Insect disease vectors control is a major public health challenge, especially in the tropics where billions of people become infected with vector-borne diseases each year, according to the World Health Organisation (2009). In temperate countries, the resurgence of new diseases is also of primary interest considering the presence of many potential disease vectors and the rapid expansion of new vectors such as *Aedes albopictus* involved in chikungunya transmission (Benedict et al. 2007). After the massive use of chemical insecticides since the fifties, the bacterio-insecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) represents a safe alternative and is now widely used for mosquito control (Lacey & Siegel 2000, Regis et al. 2001, Lacey 2007).

During sporulation *Bti* produces four main insecticidal toxins specific to dipterans: Cry4A, Cry4B and Cry11A, and one cytolytic Cyt toxin (Cyt1A) (Schnepf et al. 1998, Crickmore et al. 1998). The mixture of four synergistic toxins is one of the main advantages of this insecticide to delay resistance apparition and evolution. Indeed, only moderate levels of resistance to all toxins mixture have been described after long-lasting treatments in natural populations or after intensive laboratory selection (Goldman et al. 1986, Becker & Ludwig 1993, Georgiou & Wirth 1997, Saleh et al. 2003). In contrast, resistance to individual Cry toxins was shown to appear rapidly after exposition. It is the case, for example, for Lepidopteran pests resistant to transgenic crops expressing Cry toxin genes (Ferre & Van Re 2002, Griffit & Aroian 2005), or for mosquitoes selected with only one or a subset of the four *Bti* toxins (Georgiou & Wirth 1997). Furthermore, recent studies suggest that resistance to *Bti* toxins could appear in natural mosquito populations (Paul et al. 2005, Boyer et al. 2007, Paris et al. in press). Resistance evolution is therefore of primary concern for the long term use of this bacterio-insecticide.

When affecting major genes, resistance alleles may have pleiotropic effects and reduce the fitness cost in the absence of pesticides (Cousteau et al. 2000, Bourguet et al. 2004, Gassmann et al. 2009). The spread and the evolution of resistance in populations depend of the selective advantages linked to level of resistance but also of the negative fitness costs associated to the resistance. Indeed, the selective disadvantage induced by fitness cost of resistance can delay the evolution and the fixation of resistance in populations. Furthermore, the resistance cost on fitness is a key factor determining the choice of appropriate resistance management strategies (Lenormand et al. 1998, Roux et al. 2008). Among them, the “High-Dose-Refuge” strategy is highly recommended to delay the evolution of pest resistance to

transgenic crops Cry toxins (Vacher *et al.* 2003, Tabashnik *et al.* 2005) and is widely applied in mosquito resistance control programs. The principle of this strategy is to conserve non treated refuges in proximity of treated areas to promote survival and dispersion of susceptible insects. Its success depends principally on the counter-selection of resistance alleles in refuges due to fitness cost. Alternatively, the treatment can be interrupted during a period of time, allowing the competition between susceptible and resistant phenotypes to slow down the evolution of the resistant alleles.

Cost of insecticide resistance has been described both in selected laboratory strains and in field resistant populations (Bourguet *et al.* 2004, Gassmann *et al.* 2009). Resistance costs can be estimated by two major ways (Roux *et al.* 2005). The first one consists of the direct comparison of life-history traits associated to fitness, such as survival, reproduction or behavior, between susceptible and resistant individuals (Bourguet *et al.* 2004, Paris *et al.* 2008, Gassmann *et al.* 2009). In mosquito species, resistances to chemical insecticides were shown to increase development time or to reduce survival, fecundity, wing length or mating success (De Oliveira *et al.* 2003, Bourguet *et al.* 2004, Berticat *et al.* 2008). The second one consists in monitoring the changes in resistance allele frequencies in space (through transects between resistant and susceptible populations, Lenormand & Raymond 2000) or in time (during several generations in absence of pesticide, Gilliland *et al.* 1998, Roux *et al.* 2005). The main advantage of this method is that it allows taking into account the fitness costs expressed during all the life-stages of the resistant phenotype (Gilliland *et al.* 1998). This method is particularly efficient to estimate resistance costs in laboratory strains for whose gene flow can be controlled.

Costs of resistance to Cry toxins have been intensively studied in Lepidopteran or Coleopteran pests resistant to transgenic crops expressing Cry toxin genes (reviewed in Grassmann *et al.* 2009). About 70% of studies detected costs associated with Cry toxins resistances, affecting various phenotypic and life history traits such as development time, mass, survival or fecundity. In contrast, only one study of the fitness cost of resistance to *Bti* toxins was undertaken on a selected strain of *Culex pipiens* (Saleh 2003).

In this study we evaluated the cost of resistance to *Bti* toxins in a laboratory *Aedes aegypti* strain (LiTOX) resistant to three *Bti* Cry toxins (Cry4A, Cry4B and Cry11A). First, we measured the resistance cost on 14 traits related to life-history and fitness by comparing their values in the LiTOX and in the susceptible strain. Second, we monitored the resistance level to Cry toxins during five generations without selection.

MATERIAL AND METHODS

The resistant LiTOX strain

The *Aedes aegypti* LiTOX strain used for this study has been selected for 22 generations with leaf litters containing *Bti* from the susceptible laboratory Bora-Bora strain (Paris *et al.* in prep). We measured the level of resistance of this strain to three main *Bti* toxins: Cry4A, Cry4B and Cry11A by using recombinant *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* strains obtained from the Pasteur Institute, Paris, France (Delécluse *et al.* 1993, Poncet *et al.* 1993) and from B. Federici (Wu *et al.* 1994). Toxins solutions were prepared from 72 hours incubation under agitation at 200 rpm and 30°C in 100 ml sporulation medium (Lecadet *et al.* 1980). Spores and inclusions were harvested, washed a first time with a saline solution of NaCl 1M and EDTA 10mM, a second time with distilled water, and finally stored at -20°C until bioassays.

The resistance levels to the *Bti* toxins Cry4A, Cry4B and Cry11 were determined with a minimum of five concentrations. The lethal dose for 50% of individuals after 24h exposure (24h-LD₅₀) was calculated using the Log-Probit module of XLSTAT software (Addinsoft). The resistance ratio (RR) of the LiTOX strain was calculated by dividing its 24h-LD₅₀ with the value obtained for the susceptible strain.

Resistance cost on fitness components

To assess the pleiotropic fitness costs associated to *Bti* toxin resistance, 14 traits related to life-history and fitness were measured for the susceptible and the LiTOX strains. For all experiments, larvae developed in standard insectarium conditions (27°C, 8h/12h light/dark period and 80% relative humidity), at low density and with excess food in order to minimize intraspecific competition.

- Egg viability

Egg viability was calculated as the percentage of egg hatching 10 days after water immersion. Eggs were conserved on dry paper in standard conditions (27°C and 80% relative humidity) before experiments. Egg viability was first measured after only two weeks conservation on a total of 1500 eggs for the susceptible and LiTOX strains, divided in 3 replicates for each strain. This trait represents adults fertility. Second, in order to evaluate egg resistance to long term storage, mortality rates were calculated after six months storage in standard conditions.

A total of 1720 eggs for the susceptible strain and 6800 eggs for the LiTOX strain were used, divided in 4 and 12 replicates respectively.

- Mortality rate during development

For each strain, three replicates of 500 eggs were immersed in 10 liters of tap water. Mortality rates (in %) were calculated for larvae and pupae.

- Development time

The total development time was measured as the number of days between egg immersion in water and adult emergence. Total development time was decomposed into larval and pupal development time. Larval development time was measured as the number of days between the water immersion and the pupal stage. Pupal development time was measured as the number of days between the pupa and adult emergence. Total and larval development times were determined for three replicates of 500 individuals per strain. Development time was measured individually for 270 and 659 pupae of the susceptible and the LiTOX strain respectively.

- Sex-ratio

The sex of each individual was determined after adult emergence from three replicates of 500 larvae per strain. The proportion of females was calculated for each strain.

- Adult survival

Adult survival was measured as the number of days between adult emergence and death. Adults were provided with water only to exclude the effect of adult feeding on longevity. Adults found accidentally dead in rearing cups were discarded from the analysis. Adult survival was determined for 126 and 203 males, and for 96 and 205 females of the susceptible and the LiTOX strains respectively.

- Female fecundity

After adult emergence, three and six groups of 20 females of susceptible and LiTOX strains respectively were disposed in cages. In each cage a larger number of males (30) were added to ensure the reproduction of all females. Females were blood fed every 5 days after emergence. Female fecundity was estimated by the number of eggs laid by a female 20 days after adult emergence. For each cage, blood feeding and egg laying started 5 days after adult emergence and were repeated every 5 days, three times successively.

- Female wing length

Wing length was measured to the nearest 0.1 mm using an optical binocular for 51 susceptible and 85 LiTOX females.

- Statistical analysis

The strain effect on each of the 14 fitness components was assessed using a generalized linear model (GLM). Statistical analyses were performed using R software version 2.5 (R Development Core Team 2005). When a significant difference between susceptible and LiTOX strain was observed for a trait, the cost associated was calculated as:

$$c = | \text{susceptible mean trait} - \text{selected mean trait} | / \text{susceptible mean trait}$$

Monitoring resistance evolution in absence of selection pressure

To measure the effect of resistance costs on the evolution of resistance to *Bti*, five successive generations were maintained without selection pressure (WS strain, fig. 1). At the first generation, the WS strain was introgressed with 2.5% of susceptible Bora-Bora mosquitoes. This introgression rate is the same as performed at each generation of selection in the selected LiTOX strain. The introgression was not maintained in the WS strain in order to measure only the expression of resistance costs. The average generation turnover was 30 days, including one week egg storage.

To measure the effect of egg differential survival on resistance level we stored eggs from the first generation of the WS strain during four months to give rise to generation WS G2bis (Fig. 1).

Larval tolerance to *Bti* (Vectobac WG®, 3500 ITU/mg, International Toxic Units, Abbott Laboratories) was monitored for the five successive generations of WS strain, for the generation after egg storage (WS G2bis), and for two new generations of selection of the LiTOX strain. Larval tolerance was tested at the diagnostic dose of 0.25mg/L using standard bioassay procedure described by the World Health Organization (WHO, 2005). Bioassays were performed in plastic cups containing 20 calibrated 4th-instar larvae in 50 mL of *Bti* solution or tap water for negative controls. All bioassays were replicated eight times. The difference between each WS generation and the susceptible strain was assessed by an analysis of variance (ANOVA) and a Tukey pairwise comparisons test with R software version 2.5 (R Development Core Team 2005).

RESULTS

Resistance levels to Cry toxins

The LiTOX strain appeared more resistant than the susceptible Bora-Bora strain to the three Cry toxins tested. The RR_{50} ratios at the 22th generation were 34.6-fold, 11.1-fold and 6.3-fold for Cry4A, Cry4B and Cry11 respectively (Table 1).

Resistant cost expression on life history and fitness traits

The measures and estimates of resistance costs to *Bti* toxins on 14 fitness components are presented in Table 2. When comparing the susceptible and the resistant LiTOX strain, 5 out of 14 (36%) fitness components were found to be affected by the resistance to *Bti* toxins. Cost values ranged from 9.6 % for the total development time in males to 68.7 % for resistance of eggs to long term storage. Resistance costs expressed at various stages of mosquito's life history and affected egg, larval and adult traits. Female fecundity, a trait strongly linked to fitness, decreased by 39.9% in the LiTOX strain.

Resistance decrease after five generations in absence of selection pressure

In absence of selection, the mortality in bioassays with *Bti* increased by 8% on average per generation in the WS strain (fig. 2). After five generations without selection, the WS strain reached the mortality level of the susceptible strain ($\text{Diff} = 0.5$, $P = 0.99$) (fig. 2). By contrast, the mortality level decreased when selection pressure was maintained during two generations on the LiTOX strain. When eggs were stored during four months, the mortality level of WS G2bis increased from 55% to 76% in only one generation without selection (fig. 3).

DISCUSSION

Fitness cost associated with *Bti* resistance

Out of the fifteen fitness traits analysed, five were significantly affected in the resistant strain: egg survival to long-term storage, larval development time, total development time for both sexes, and female fecundity.

Female fecundity decreased by nearly 40% in the resistant strain, but wing length was not affected by resistance. Wing length was shown to be an accurate predictor of body size and of fecundity in mosquitoes, including several *Aedes* species (Packer and Corbet 1989; Briegel 1990; Blackmore and Lord 2000; Mori et al. 2008; Leisnham et al. 2009). Large females usually have large wings and lay more eggs, and this relationship was shown to be directly related to the environmental conditions encountered during larval development such as food availability and larval density (Strickman and Kittayapong 2003). In studies evaluating the cost of resistance to insecticides in mosquitoes, the resistant phenotype usually exhibit smaller wing length (Bourguet et al. 2004) but this is not always the case. In a recent study on *Ae. aegypti* populations from Mexico, females surviving exposure to spinosad, a bio-insecticide produced during the fermentation of a soil actinomycete, had slightly larger wings and higher fecundity, but lower fertility (egg hatching) than unexposed females (Antonio et al. 2009). In the present study, resistant female wing length was unchanged, female fecundity was strongly decreased, while fertility was not affected. We observed very little variation in wing length within and between the two strains, perhaps because larval development took place at low larval densities, without food limitation. The observed dramatic decrease in resistant females' fecundity is therefore not explained by a smaller body size. Other explanations involve pleiotropic effects on reproduction of genes involved in resistance. For example, mutations in the toxin-binding insect's gut receptors or in enzymes involved in pro-toxin activation may protect insect against *Bti* toxins but modify their normal physiological role, thereby affecting all the mosquito life-stages and adult fecundity. Larval selection with *Bti* in *Culex pipiens* for 20 generations caused a 44.8% reduction in female fecundity, but no significant reduction in fertility (Saleh et al. 2003), as found in the present study. Adult longevity was not affected in the *Culex pipiens* selected strain, as found for our *Ae. aegypti* selected strain. Another similarity between the two studies is that the level of resistance to commercial *Bti* was about the same in the selected *Culex* and *Aedes* strains (about 2-fold resistance). All these similarities suggest that the resistant mechanisms evolved against *Bti*

toxins might be similar in *Culex* and in *Aedes*. Unfortunately, the study on *Culex pipiens* did not include the other fitness traits we measured in *Ae. aegypti*.

Although fertility (i.e. egg hatchability) did not differ between strains, egg survival decreased by 68% in the resistant strain after 6 months storage. This lower tolerance to desiccation could reflect a lower maternal investment in egg quality. Low tolerance of eggs to long periods of desiccation is likely to strongly lower fitness of resistant individuals in temperate climates where the cold period is typically longer than 6 months, and where most *Aedes* species over-winter as eggs.

Total development time increased by about one day in the selected strain in males, and by nearly two days in females. This increase was mostly due to an increase in larval development time, since pupal duration was not significantly different between the strains. A genetic trade off between larval development time and adult size was found in *Anopheles gambiae* (Lehmann et al 2006), with a longer development time associated with a smaller adult size. We did not find such trade-off: a longer development time in the *Ae. aegypti* LiTOX strain did not result in a wing length (surrogate for adult size) different from the susceptible strain. The increase in larval development time observed in the resistant strain could be linked to the gut injuries inflicted by *Bti* toxins binding, gut epithelium repair necessitating a reallocation of resources, and a longer development time to reach the pupal stage. In support to this hypothesis, an increase in larval development time was observed in the spruce budworm *Choristoneura fumiferana* fed on sublethal dose of *Bt* toxin (Bauce et al. 2002). Increase in larval development time in the resistant strain represented a fitness cost of 17.3%. Variation in larval development time is the primary source of variation in mean generation time in natural populations of mosquitoes (Moeur and Istock 1980), and mean generation time is a fundamental component of fitness, especially in expanding populations (Charlesworth 1980).

The number of studies testing for fitness costs associated with resistance to *Bt* toxins has considerably increased over the past 20 years due to the increasing use of *Bt* sprays and *Bt* crops in agriculture (Gassmann et al 2009). In a recent meta-analysis of 77 studies including 3 species of chrysomelid beetles and 14 moths resistant to *Bt* crops, fitness costs were detected in 62% of selection experiments and 34% of fitness component comparisons. Mean fitness costs were 15.5% for survival, 7.4% for development time and 2.5% for mass. By comparison, we found no fitness cost on adult survival or size, but a 68% cost to long-term egg survival, a 17.3% cost for development time, and nearly 40% cost for female fecundity.

Interestingly, the only study so far that has evaluated *Bti* resistance fitness cost was performed on *Culex pipiens* (Saleh et al. 2003) and found costs of similar magnitude on similar traits we observed in *Aedes*.

The genetic background is known to influence the expression of fitness costs due to epistatic interactions (Roux et al. 2005b; Paris et al. 2008; Vila-Aiub et al. 2009), and differences in traits can be due to different genetic background between the compared lineages. In the present study, we compared a recently selected strain with its progenitor. The common genetic background between the two strains avoid biases due to interaction between resistant alleles and other genes, and differences in the measured traits are likely to be linked to *Bti* resistance.

Resistance cost and decrease of *Bti* resistance in absence of selection

A decrease in *Bti* resistance was observed in the LiTOX strain in absence of selection pressure. The costs of resistance are so high that in only five generations without selection, the level of resistance reached the level of resistance of the susceptible strain. Selection experiments provide a global measurement of fitness cost expressed per generation, by summing costs across all fitness components. This rapid decline in resistance we observed in laboratory conditions is promising by opening perspectives to efficient managing strategies. However, compensatory mutations decreasing fitness costs are likely to be selected for, especially in natural populations with a large standing variation. The selection of allelic combinations conferring both resistance and reduced fitness costs from genetic diversity already present within the population is the first mechanism to act in recently treated areas. Then, new mutations decreasing fitness costs can appear and accumulate. Finally, the replacement of the costly resistant allele by a less costly resistant allele can occur at the same or at another locus (Roush and McKenzie 1987; Labbe et al. 2009). In *Culex pipiens* both allele replacement and new resistance mechanisms were successively selected in only 20 years in French local populations treated with organophosphate insecticides (Guillemaud et al. 1998, Labbe et al. 2007). In our case, the probability of apparition of such new compensatory mutations is limited due to the low number of generations and effective population size.

Expression of resistance costs in natural populations

The variation in fitness traits measured in the laboratory may be more or less costly depending on the ecological conditions experienced in the field. For example, in temperate

regions, eggs will usually persist for a long time in the environment (usually during winter), and the fitness cost in terms of egg survival to long-term storage will express. In contrast, it is presumably of lower importance in tropical regions where the successive mosquito generations usually do not require egg diapause. However, in tropical regions with many successive generations, the costs on larval development time and female fecundity will be expressed. Finally, for a similar period of time (6 months in our study), the resistance level is decreased down to the level of the susceptible strain in both environments, even-though different fitness costs are expressed and involved in the counter-selection of resistant individuals.

The fitness costs were measured in laboratory optimal breeding conditions in the laboratory (no food limitation, optimum breeding temperature...), that are not representative of the conditions encountered in the field. Indeed, fitness costs are likely to be underestimated in optimal conditions because stressing environments and/or limited resources might be more deleterious for resistant individuals (Kishony and Leibler 2003; Hardstone et al. 2009). For example, higher fitness costs were observed for caterpillars fed on host plants than on artificial diet (Gassmann et al. 2009), and the magnitude of resistance costs associated with *Bt* resistance in the generalist Lepidopteran herbivore *Trichoplusia ni* was shown to vary with the host-plant (Janmaat and Myers 2005).

Furthermore, fitness costs are differentially expressed depending on interactions with other organisms such as predation, parasitism or competition, and ecological fitness costs can be more apparent in natural population under strong competitive conditions (Bourget et al. 2004; Vila-Aiub et al. 2009). In the presence of larval predators or parasites, a delay in development is likely to lower the probability of surviving the larval stage (Agnew and Koella 1999; Yan et al. 1997), hence decreasing even more the fitness of the resistant phenotype than measured in laboratory conditions. Therefore, an increase in the larval development time should be more deleterious for mosquito populations submitted to intense predation or parasitism pressure.

Strategies of treatment and resistance monitoring

Although commercial *Bti* mixture is a combination of several toxins, the evolution of resistant alleles in treated populations will probably occur soon or late, in the absence of managing strategies to slow down their frequencies. The high cost of resistance to *Bti* expressing at various mosquito life stages opens perspectives for managing *Bti* resistance

before the resistant alleles spread into populations. The cornerstone of resistance management is the ‘high dose-refuge’ strategy in which some sites are massively treated while adjacent sites remain untreated, allowing the persistence of a population of susceptible insects. This strategy is particularly efficient when resistance is at least partly recessive, and relies on the competitive superiority of susceptible individuals in non-treated sites (due to the cost of resistance) that will invade adjacent treated areas, mating to the few surviving resistant individuals. The success of this strategy therefore depends on the cost of resistance, the dominance level of the resistant alleles, and the migration rate of insects between untreated and treated sites. This later will determine the proportion of refuges required, and their spatial arrangement. The size and disposition of these refuges have been heavily modelled but only in situations involving a single, bi-allelic resistance locus (Tabashnik and Croft 1982; Onstad and Gould 1998; Lenormand and Raymond 1998; Caprio 2001). In the case of resistance to *Bti*, a mixture of toxins with various mechanisms of action, the resistance is likely to involve many unlinked loci with various levels of dominance (Bonin et al 2009; Paris et al 2010). The selection of fully resistant genotypes is likely to take a longer time than in the case of monolocus resistance, because of recombination disrupting advantageous resistant allele combinations at each generation. Indeed, even under strong selective pressure in the laboratory, the response to selection in the LiTOX strain does not appear to slow down over time (about 10% less mortality per generation, Fig. 2), suggesting that resistant alleles are not yet fixed. However, the multi-genic basis of *Bti* resistance in *Ae. aegypti* is not a guarantee that resistance will not evolve in natural populations. Indeed, high resistance levels evolved in field *Culex pipiens* populations treated with *Bacillus sphaericus*, despite the fact that resistance involves at least two recessive loci. Complex interactions between these two loci appear to protect each recessive mutant from disappearing when both are rare, leading to a rapid increase in frequency of the resistant alleles in natural populations (Chevillon et al. 2001). In the case of resistance to *Bti* in *Aedes aegypti*, the genes involved, and the dominance level of the resistant alleles are not yet known. Further characterization of mechanisms underlying resistance to *Bti* is essential for developing an efficient management of resistance in field populations.

CONCLUSION

Managing resistance to insecticides depends on associated fitness costs such that the frequency of resistance alleles will decline when selection is reduced by using insecticide

rotations, temporal refuges (periods without *Bti* treatment), or spatial refuges (areas not treated with *Bti*). We show that the storage of *Ae. aegypti* eggs for four months is long enough to counter-select resistance alleles suggesting that *Bti* resistance is likely to be slowed down in temperate climates, at least for mosquito species over-wintering as eggs. This could partly explain the lack of resistance detection in European countries using *Bti* since decades. The fitness costs we observed when relaxing the selective pressure are sufficient to counter-select resistant individuals in only five generations. This suggests that in tropical regions with a rapid turn-over of generations, only few generations without treatment would allow to limit resistance evolution. The possibility to easily counter-select resistant individuals taking advantage of the resistance costs expressed in tropical or in temperate environments opens optimistic perspectives to preserve the long term efficiency of this environmentally safe bio-insecticide against mosquitoes. However, total lack of treatment against mosquitoes for several consecutive generations would not be possible in tropical regions where mosquitoes represent major threats to human health. So far, unlike in European countries where *Bti* is now the only insecticide allowed for mosquito control, tropical countries still use chemical insecticides against adult mosquitoes. Combining chemical insecticides against adults together with *Bti* against larvae every few generations could contribute to *Bti* resistance in tropical regions.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank Joelle Patoureau, Sylvie Veyrenc, Fabien Laurent and Sophia Weeb for technical assistance, and Brian Federici and Maria-Helena Neves Lobo Silva-Filha for providing recombinant *Bti* strains. This study was supported by the French National Research Agency (project ANR-08-CES-006-01 DIBBECO), by a grant to MP and LD from the French Rhône-Alpes region (grants #0501545401) and by a collaborative grant attributed by the Démoustication Rhône-Alpes.

REFERENCES

- Agnew P, Koella JC (1999) Life history interactions with environmental conditions in a host-parasite relationship and the parasite's mode of transmission. *Evolutionary Ecology* **13**, 67-89.
- Becker N, Ludwig M (1993) Investigations on possible resistance in *Aedes-vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus-thuringiensis-israelensis*. *Journal of The American Mosquito Control Association* **9**, 221-224.
- Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, Lounibos LP (2007) Spread of the tiger: Global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases* **7**, 76-85.
- Berticat C, Bonnet J, Duchon S, *et al.* (2008) Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *Bmc Evolutionary Biology* **8**.
- Blackmore MS, Lord CC (2000) The relationship between size and fecundity in *Aedes albopictus*. *Journal Of Vector Ecology* **25**, 212-217.
- Bourguet D, Guillemaud T, Chevillon C, Raymond M (2004) Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution* **58**, 128-135.
- Boyer S, Tilquin M, Ravanel P (2007) Differential sensitivity to *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* and temephos in field mosquito populations of *Ochlerotatus cataphylla* (Diptera: Culicidae): Toward resistance? *Environmental Toxicology and Chemistry* **26**, 157-162.
- Briegel H (1990) Metabolic Relationship Between Female Body Size, Reserves, And Fecundity Of *Aedes-Aegypti*. *Journal Of Insect Physiology* **36**, 165-172.
- Carriere Y, Tabashnik BE (2001) Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* **268**, 1475-1480.
- Coustau C, Chevillon C, ffrench-Constant R (2000) Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends In Ecology & Evolution* **15**, 378-383.
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, *et al.* (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 807.
- De Oliveira CMF, Costa F, Beltran JFN, Silva-Filha MH, Regis L (2003) Biological fitness of a *Culex quinquefasciatus* population and its resistance to *Bacillus sphaericus*. *Journal Of The American Mosquito Control Association* **19**, 125-129.
- Delecluse A, Poncet S, Klier A, Rapoport G (1993) Expression Of *CryIa* And *CryIb* Genes, Independently Or In Combination, In A Crystal-Negative Strain Of *Bacillus-Thuringiensis* Subsp *Israelensis*. *Applied And Environmental Microbiology* **59**, 3922-3927.
- Ferre J, Van Rie J (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review Of Entomology* **47**, 501-533.
- Gassmann AJ, Carriere Y, Tabashnik BE (2009) Fitness Costs of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review Of Entomology* **54**, 147-163.
- Georghiou GP, Wirth MC (1997) Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Applied and Environmental Microbiology* **63**, 1095-1101.

- Gilliland LU, McKinney EC, Asmussen MA, Meagher RB (1998) Detection of deleterious genotypes in multigenerational studies. I. Disruptions in individual *Arabidopsis* actin genes. *Genetics* **149**, 717-725.
- Goldman IF, Arnold J, Carlton BC (1986) Selection for resistance to *Bacillus-thuringiensis* subspecies *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes-aegypti*. *Journal of Invertebrate Pathology* **47**, 317-324.
- Griffitts JS, Aroian RV (2005) Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *Bioessays* **27**, 614-624.
- Lacey LA (2007) *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of The American Mosquito Control Association* **23**, 133-163.
- Lacey LA, Siegel JP (2000) Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria. In: Charles J.-F., Delécluse A. and Nielsen-LeRoux C., eds. "Entomopathogenic Bacteria: From laboratory to field application". 253-273.
- Lecadet MM, Blondel MO, Ribier J (1980) Generalized Transduction In *Bacillus-Thuringiensis* Var Berliner-1715 Using Bacteriophage-Cp-54ber. *Journal Of General Microbiology* **121**, 203-212.
- Lehmann T, Dalton R, Kim EH, *et al.* (2006) Genetic contribution to variation in larval development time, adult size, and longevity of starved adults of *Anopheles gambiae*. *Infection Genetics And Evolution* **6**, 410-416.
- Lenormand T, Raymond M (1998) Resistance management: the stable zone strategy. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* **265**, 1985-1990.
- Lenormand T, Raymond M (2000) Analysis of clines with variable selection and variable migration. *American Naturalist* **155**, 70-82.
- May RM, Dobson AP (1986) Population dynamics and the rate of evolution of pesticide resistance. In: Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management, 170-191. National Academy press, Washington, D. C.
- Moeur JE, Istock CA (1980) Ecology And Evolution Of The Pitcher-Plant Mosquito.4. Larval Influence Over Adult Reproductive-Performance And Longevity. *Journal Of Animal Ecology* **49**, 775-792.
- Mori A, Romero-Severson J, Black WC, Severson DW (2008) Quantitative trait loci determining autogeny and body size in the Asian tiger mosquito (*Aedes albopictus*). *Heredity* **101**, 75-82.
- Packer MJ, Corbet PS (1989) Size Variation And Reproductive Success Of Female *Aedes-Punctor* (Diptera, Culicidae). *Ecological Entomology* **14**, 297-309.
- Paris M, Roux F, Berard A, Reboud X (2008) The effects of the genetic background on herbicide resistance fitness cost and its associated dominance in *Arabidopsis thaliana*. *Heredity* **101**, 499-506.
- Paul A, Harrington LC, Zhang L, Scott JG (2005) Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *Journal of The American Mosquito Control Association* **21**, 305-309.
- Poncet S, Anello G, Delecluse A, Klier A, Rapoport G (1993) Role Of The CryIv Polypeptide In The Overall Toxicity Of *Bacillus-Thuringiensis* Subsp *Israelensis*. *Applied And Environmental*

- Microbiology* **59**, 3928-3930.
- Regis L, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF (2001) Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends in Parasitology* **17**, 377-380.
- Roux F, Camilleri C, Berard A, Reboud X (2005) Multigenerational versus single generation studies to estimate herbicide resistance fitness cost in *Arabidopsis thaliana*. *Evolution* **59**, 2264-2269.
- Roux F, Paris M, Reboud X (2008) Delaying weed adaptation to herbicide by environmental heterogeneity: a simulation approach. *Pest Management Science* **64**, 16-29.
- Saleh MS, El-Meniawi FA, Kelada NL, Zahran HM (2003) Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie* **127**, 29-32.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, *et al.* (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 775.
- Strickman D, Kittayapong P (2003) Dengue and its vectors in Thailand: Calculated transmission risk from total pupal counts of *Aedes aegypti* and association of wing-length measurements with aspects of the larval habitat. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* **68**, 209-217.
- Tabashnik BE, Dennehy TJ, Carriere Y (2005) Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **102**, 15389-15393.
- Vacher C, Bourguet D, Rousset F, Chevillon C, Hochberg ME (2003) Modelling the spatial configuration of refuges for a sustainable control of pests: a case study of Bt cotton. *Journal Of Evolutionary Biology* **16**, 378-387.
- Wirth MC, Delecluse A, Federici BA, Walton WE (1998) Variable cross-resistance to Cry11B from *Bacillus thuringiensis* subsp. *jegathesan* in *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae) resistant to single or multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*. *Applied And Environmental Microbiology* **64**, 4174-4179.
- Wu D, Johnson JJ, Federici BA (1994) Synergism Of Mosquitocidal Toxicity Between CytA And CryIvD Proteins Using Inclusions Produced From Cloned Genes Of *Bacillus-Thuringiensis*. *Molecular Microbiology* **13**, 965-972.
- Yan G, Severson DW, Christensen BM (1997) Costs and benefits of mosquito refractoriness to malaria parasites: Implications for genetic variability of mosquitoes and genetic control of malaria. *Evolution* **51**, 441-450.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: History and selection pressure submitted to the LiTOX, the WS and the WSbis strains.

Figure 2: Evolution of mortality rate with and without *Bti* selection pressure during 5 generations.

Figure 3: Mortality rate of the WS and the WSbis strain compared to the susceptible strain after two generations without selection.

TABLES AND FIGURES

Table 1. Lethal concentrations and resistance ratio of the LiTOX strain to *Bti* toxins.

toxin	Total No. of larvae	Strain	LC50	IC 95%	resistance ratio
Cry4A	410	susceptible	25.063	(20.698 - 30.802)	34.6
	500	LiTOX	866.332	(547.599 - 1785.178)	
Cry4B	400	susceptible	0.382	(0.302 - 0.481)	11.1
	560	LiTOX	4.247	(3.274 - 5.667)	
Cry11	360	susceptible	8.791	(7.309 - 11.078)	6.3
	550	LiTOX	55.76	(47.797 - 65.896)	

Table 2. Mean trait value and cost associated with *Bti* resistance for 14 life history traits.

Fitness component	Susceptible (\pm SE)	LiTOX (\pm SE)	Cost value (%)	significance
<u>Egg viability</u>				
Fertility (%)	79.73 (\pm 1.80)	82.53 (\pm 3.41)	-	NS
Viability after 6 months storage (%)	55.72 (\pm 16.08)	17.46 (\pm 4.67)	68.7	*
<u>Survival</u>				
Larval mortality (%)	0.17 (\pm 0.09)	0.16 (\pm 0.08)	-	NS
Pupal mortality (%)	0.83 (\pm 0.51)	0.98 (\pm 0.32)	-	NS
Adult survival of male (<u>No. of days</u>)	3.70 (\pm 0.14)	3.75 (\pm 0.07)	-	NS
Adult survival of female (<u>No. of days</u>)	5.17 (\pm 0.08)	5.20 (\pm 0.11)	-	NS
			-	
<u>Proportion of females</u>	49.86 (\pm 4.83)	50.04 (\pm 0.65)	-	NS
<u>Development time</u>				
Larval (<u>No. of days</u>)	9.00 (\pm 0.17)	10.58 (\pm 0.17)	17.6	***
Pupal male (<u>No. of days</u>)			-	NS
Pupal female (<u>No. of days</u>)	2.31 (\pm 0.05)	2.50 (\pm 0.04)	-	NS
Total male (<u>No. of days</u>)	9.90 (\pm 0.09)	10.85 (\pm 0.14)	9.6	***
Total female (<u>No. of days</u>)	12.06 (\pm 0.41)	13.85 (\pm 0.17)	12.9	***
<u>Female fecundity</u>				
No. of eggs laid after 3 weeks	210.43 (\pm 17.43)	144.52 (\pm 11.16)	39.9	***
<u>Female wing length (mm)</u>				
	3.33 (\pm 0.05)	3.30 (\pm 0.04)	-	NS

Figure 1.

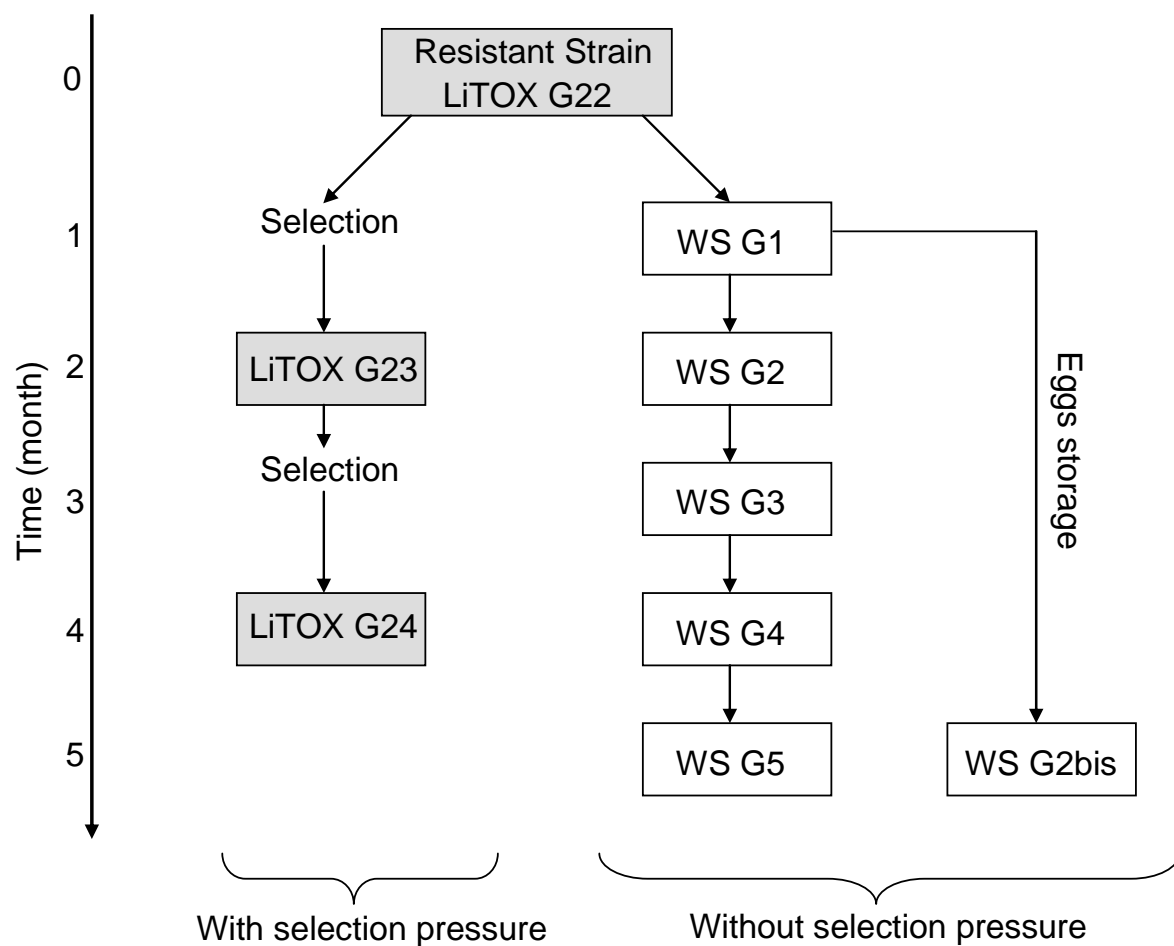


Figure 2.

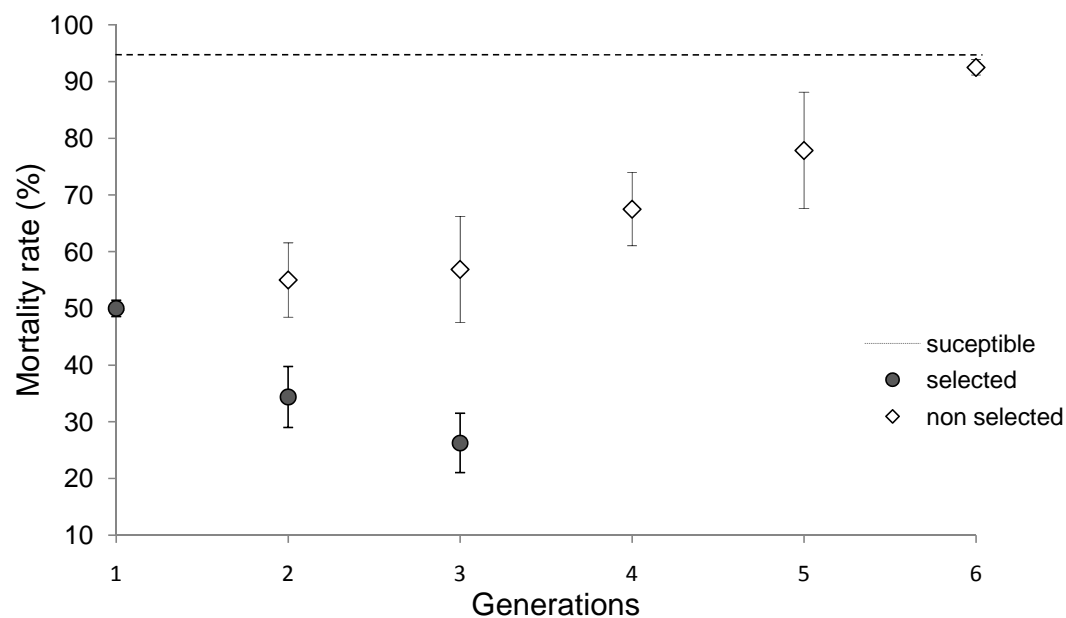
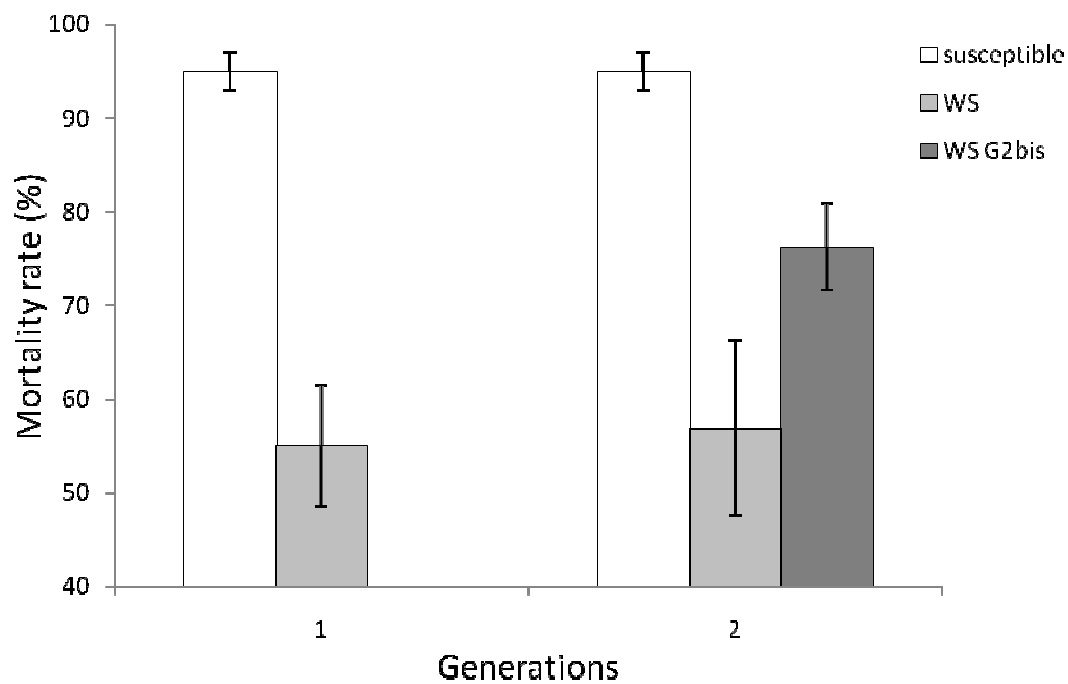


Figure 3.



Chapitre 5- Génomique des populations du moustique *Aedes rusticus* traité depuis plus de 15 ans dans la région Rhône-Alpes

I- Présentation de l'étude et principaux résultats

En **région Rhône-Alpes**, l'Entente interdépartementale pour la démoustication (EID) s'occupe de démoustiquer et de gérer les espaces naturels sensibles. Afin de limiter les pollutions et les impacts négatifs sur les espèces non-cibles dans ces milieux, cette agence utilise depuis une vingtaine d'années le *Bti* pour les traitements anti-larvaires. Pour être démoustiquée, une commune doit adhérer et cotiser à cet organisme : la région Rhône-Alpes est donc composée de « patchs » de zones traitées et de zones non traitées au *Bti*. De plus, certains gîtes semblent favorables à la persistance, voire à la prolifération du *Bti* (article 1 : Tilquin et al 2008), ce qui est susceptible de favoriser l'apparition de résistances localement. Il est donc apparu intéressant de faire un état des lieux de l'évolution de la résistance dans la région. D'autre part, connaître la structure des populations des espèces Rhône-Alpines et les flux de gènes entre les populations traitées et non traitées peut permettre d'estimer :

- le potentiel de propagation des résistances à l'échelle de la région,
- la possibilité de limiter l'évolution des résistances grâce aux flux d'allèles sensibles provenant des populations non traitées.

L'espèce Rhône-Alpine *Aedes rusticus* a été choisie pour cette étude car c'est une des espèces de la région présentant des capacités de vol limitées et donc susceptible de présenter une structure à l'échelle régionale. De plus, on la retrouve dans des gîtes larvaires en sous-bois où le *Bti* prolifère. Nous avons échantillonné pour cette étude **13 populations de cette espèce** réparties sur cinq aires géographiques de la région Rhône-Alpes, incluant 7 populations traitées depuis plus de 15 ans au *Bti* (article 7 : Paris et al., sous presse).

Les bioessais effectués sur ces populations ont montré une baisse globale de la sensibilité au *Bti* dans les populations traitées, cependant la différence entre les populations traitées et non traitées n'est pas significative.

Nous avons ensuite analysé la distribution de la variabilité génétique pour 155 marqueurs AFLP dans les 13 populations. Nous n'avons observé ni structure géographique, ni isolement par la distance à l'échelle de la région Rhône-Alpes, avec globalement **une faible**

différenciation génétique entre les populations ($F_{ST} = 0.0366 \pm 0.167$). Contrairement à ce qui avait été décrit par observation directe des mouvements des adultes de cette espèce (Schäfer *et al.* 1997), les données génétiques indiquent la présence de fort flux de gènes entre les populations de la région Rhône-Alpes. Cependant, la plupart des F_{ST} par paire de population sont significatifs, ce qui suggère **une structure en métapopulation** pour cette espèce avec probablement de fort taux d'extinction et de recolonisation entre les gîtes larvaires. Enfin, aucune baisse de diversité génétique liée aux traitements n'a été observée en comparant les populations traitées et non traitées au *Bti*.

En plus de l'étude de génétique des populations, les marqueurs AFLP ont été utilisés pour rechercher des traces de sélection liées au traitement au *Bti*. Pour cela, deux méthodes de détection d'*outliers* ont été utilisées tout d'abord sur l'ensemble des 13 populations, puis **sur les 42 paires de populations traitées/non traitées**, avec les logiciels Dfdist (Beaumont & Nichols 1996) et BayeScan (Foll & Gaggiotti 2008). Un locus a été considéré *outlier* lorsqu'il était détecté dans au moins cinq comparaisons indépendantes de populations traitées/non traitées. Au final, **cinq loci outliers ont été détectés** à 95% avec les deux méthodes. La mise en évidence de loci potentiellement sous sélection en relation avec les traitements au *Bti* semble indiquer que la sélection d'allèles de résistance à certaines toxines du *Bti* est en cours dans les populations naturelles bien que non encore décelable par des bioessais au *Bti* comprenant les six toxines en mélange. Les résultats obtenus en laboratoire sur la souche d'*Aedes aegypti* LiTOX peuvent appuyer cette hypothèse, car malgré une résistance de plus de 30 fois à la toxine Cry4A, cette souche montre une résistance de seulement 2 fois au *Bti* total. Dans l'avenir, il serait intéressant de tester la sensibilité des populations de moustiques de terrain à chacune des toxines individuellement plutôt qu'au *Bti* total afin de détecter l'apparition de résistances aux toxines du *Bti*.

Les perspectives de ce travail sont également de séquencer les 5 loci *outliers* détectés chez l'espèce *Ae. rusticus*, de les replacer sur le génome d'*Ae. aegypti*. Cela permettrait de déterminer si les mêmes régions du génome sont impliquées dans la résistance au *Bti* chez les populations de terrain et chez la souche de laboratoire LiTOX.

II- Contribution scientifique sous forme d'article

Article 7 : PARIS M, BOYER S, BONIN A, COLLADO A, DAVID JP, DESPRES L. (2010). Genome scan in the mosquito *Aedes rusticus*: population structure and detection of positive selection after insecticide treatment. *Molecular Ecology* 19, 325:337.

Chapitre 5 - Article 7

Genome scan in the mosquito *Aedes rusticus*: population structure and detection of positive selection after insecticide treatment.

Margot PARIS, Sébastien BOYER, Aurélie BONIN, Amandine COLLADO, Jean-Philippe DAVID, Laurence DESPRES

Molecular Ecology (2010) 19, 325:337

Genome scan in the mosquito *Aedes rusticus*: population structure and detection of positive selection after insecticide treatment

MARGOT PARIS, SÉBASTIEN BOYER, AURÉLIE BONIN, AMANDINE COLLADO, JEAN-PHILIPPE DAVID and LAURENCE DESPRES

Laboratoire d'Ecologie Alpine, CNRS-UMR 5553, Université Joseph Fourier, BP 53, 38041 Grenoble Cedex 09, France

Abstract

Identification of genes involved in local adaptation is particularly challenging for species functioning as a network of interconnected populations undergoing frequent extinctions–recolonizations, because populations are submitted to contrasted evolutionary pressures. Using amplified fragment length polymorphism markers, population genetic structure of the mosquito *Aedes rusticus* was analysed in five geographical areas of the French Rhône-Alpes region. We included a number of sites that were treated with the bio-insecticide *Bacillus thuringiensis israelensis* (*Bti*) for more than 15 years. Analysis of molecular variance revealed that most of the genetic variability was found within populations (96%), with no significant variation among geographical areas, although variation among populations within areas (4%) was significant. The global genetic differentiation index F_{ST} was low (0.0366 ± 0.167). However, pairwise F_{ST} values were significant and no isolation-by-distance at the regional level was observed, suggesting a metapopulation structure in this species. *Bti*-treatment had no effect on genetic structure and on within-population genetic diversity. Potential signatures of positive selection associated with *Bti*-treatment were detected for five loci, even though toxicological bioassays performed on field-collected larvae showed no significant difference in mortality between *Bti*-treated and nontreated sites. The difficulty of detecting moderate resistance in field-collected larvae together with possible differential persistence of toxins in the environment may explain our inability to detect a toxicological response to *Bti* in treated sites. The evidence for positive selection occurring at several genomic regions suggests a first step towards *Bti* resistance in natural mosquito populations treated with this bio-insecticide. Furthermore, this signal was detectable using genomic tools before any toxicological evidence for resistance could be identified.

Keywords: amplified fragment length polymorphism (AFLP), ecotoxicology, genetic variation, metapopulation, population differentiation, resistance to *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*)

Received 16 December 2008; revision received 12 October 2009; accepted 21 October 2009

Introduction

Understanding mechanisms of selection and adaptation at the genomic level has become a central challenge in evolutionary biology (Orr 2005; Stinchcombe & Hoekstra 2008). The identification of genomic regions and genes involved in local adaptation is an especially diffi-

cult task in natural populations because they are subject simultaneously to several evolutionary forces with different effects. Insecticide resistance is a spectacular example of rapid adaptation to strong selection pressures and offers the opportunity to better understand the molecular bases of such evolutionary processes. Combining both academic and important applied issues, the mechanisms of resistance to insecticides in pathogen vectors such as mosquitoes have been particularly studied during the last decade. To date, resistance

Correspondence: Margot Paris, Fax: +33 4 76 51 42 79; E-mail: margotparis1@gmail.com

of mosquitoes has been reported to most chemical insecticide classes, and the major mechanisms or genes involved have been identified (Ffrench-Constant *et al.* 2004; Hemingway *et al.* 2004; Li *et al.* 2007).

An alternative to chemical insecticides in mosquito control programmes is the spraying of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) toxins in aquatic sites where mosquitoes breed and their larvae develop (Regis *et al.* 2001; Lacey 2007). The amount of *Bti* spread in the environment is expected to increase worldwide, whilst the persistence of commercial *Bti* in ecosystems is under question (Tilquin *et al.* 2008). Indeed, leaf litter collected in several mosquito breeding sites in the French Rhône-Alpes region have recently been shown to contain high concentrations of viable *Bti* spores (Tilquin *et al.* 2008). In some cases, these leaf litters were shown to be highly toxic to mosquito larvae, suggesting that toxins can also persist in the environment (David *et al.* 2002). Leaf litter and organic detritus represent a major larval food source for most mosquito species. As a result, in treated sites, larvae are exposed to *Bti* toxins throughout their development. This evidence for long-lasting persistence of *Bti* in natural mosquito habitats should lead to increasing concern about the possible development of resistance in mosquito populations, especially in sites regularly treated with *Bti*. The French Rhône-Alpes region has been a pioneer in France for the exclusive use of *Bti* against mosquitoes for more than 15 years and is therefore an appropriate area for investigating *Bti* resistance in natural mosquito populations.

Bacillus thuringiensis subsp. *israelensis* produces a mixture of four major insecticidal proteins that belong to two main families: three Cry toxins (Cry4A, Cry4B and Cry11A) and one cytolytic Cyt toxin (Cyt1A) (Crickmore *et al.* 1998; Schnepf *et al.* 1998). These toxins interact synergistically, particularly the protein Cyt1A with the Cry toxins, considerably improving the toxicity of the mixture (Poncet *et al.* 1995; Perez *et al.* 2005). Furthermore, the Cyt toxin has the ability to markedly reduce resistance to Cry toxins in mosquitoes (Wirth *et al.* 1997, 2003) and appears to be the key protein hindering the rapid development of resistance to *Bti* (Georghiou & Wirth 1997). Indeed, only low resistance levels (two- to three-fold) has been reported so far after several generations of intense selection pressure in the mosquito *Aedes aegypti* (Goldman *et al.* 1986) and in *Culex quinquefasciatus* (Georghiou & Wirth 1997; Saleh *et al.* 2003). In natural populations, despite recent studies suggesting that resistance to *Bti* might occur at a local scale (Paul *et al.* 2005; Boyer *et al.* 2007), no consistent resistance has been detected even after long periods of repeated *Bti* treatments (Goldman *et al.* 1986; Becker & Ludwig 1993). However, the long-term persistence of the different toxins in the environment is not

known. If some toxins are more persistent than others, the selective pressure at play in natural populations may be quite different from the full toxins mixture tested in the laboratory.

One of the predominant mosquito species in the Rhône-Alpes region is *Aedes rusticus* Rossi. The adults emerge in early spring and can reproduce throughout the warm season as long as their breeding sites (temporary ponds) are available (typically after rainy periods). This temporal variability of breeding site availability is likely to result in a metapopulation structure at the regional scale, i.e. a network of populations with their own demographic dynamics interconnected by more or less intensive gene flow (Hanski & Gilpin 1991). The aquatic larval stage persists throughout winter, with larvae mainly feeding on decomposing leaf litter (Clements 1992). It has been shown that *Ae. rusticus* is one of the less sensitive species of the *Aedes* genus to leaf litter containing high levels of *Bti* toxins (Rey *et al.* 2001). Furthermore, previous analyses revealed that an *Ae. rusticus* population collected in a nontreated site was more sensitive to toxic leaf litter containing *Bti* toxins than were other populations collected in treated sites, suggesting that resistance to *Bti* in this species might have evolved in particular treated sites (David *et al.* 2003). Therefore, among mosquito species, *Ae. rusticus* appears to be a good model to examine whether mosquito populations from the French Rhône-Alpes region have evolved *Bti* resistance during the last 15 years of intensive *Bti* treatments and whether these treatments have had an impact on mosquito genetic diversity and population structure.

Selection is expected to increase the frequency of locally advantageous alleles, resulting in higher among-population differentiation at these adaptive loci (measured by locus-specific F_{ST}) compared with differentiation in the rest of the genome (neutral loci). Because of hitchhiking effects, a signature of positive selection can be detected directly in the genes under selection and also in neutral flanking regions, in some situations (Schlötterer 2003). Positive selection for *Bti* toxin resistance should lead to increased genetic differentiation between treated and nontreated sites near loci involved in resistance. Detecting these 'outlier' loci from background neutral variability because of drift and mutations in genome scans is an active and challenging research area because of the difficulty of pinpointing truly significant loci while avoiding the detection of false positives. This is an especially ambitious task for dominant markers such as amplified fragment length polymorphisms (AFLPs), although the AFLP technique represents a convenient way to easily scan hundreds of markers scattered throughout the genomes of non-model species (Wilding *et al.* 2001; Campbell & Bernatchez

2004; Bonin *et al.* 2006, 2007; Joost *et al.* 2007; Egan *et al.* 2008). To date, the most popular method available for detecting outlier loci from AFLP genome scans is implemented in the program Dfdist, a program for dominant markers especially modified from Fdist (Beaumont & Nichols 1996). This method, based on summary statistics and on a symmetrical island model, might generate false positives when assumptions such as the drift-migration equilibrium are transgressed. In species such as mosquitoes, relying on temporary ponds for their reproduction, populations are likely to experience different demographic histories. In contrast, hierarchical-Bayesian approach taking into account different intensities of drift in the different populations, might detect true outlier loci more efficiently (Beaumont & Balding 2004; Foll & Gaggiotti 2008). Another way to increase the true positive outlier detection rate is to replicate pairwise comparisons between populations from contrasted environments (Campbell & Bernatchez 2004; Bonin *et al.* 2006; Nosil *et al.* 2008). It eliminates those loci that are detected in only a few comparisons and likely to be false positives, or those revealed in comparisons always involving the same population and therefore likely to be linked to population-specific adaptation unrelated to the ecological pressure under analysis. However, this approach should be used with caution, because the threshold used to retain a locus as a statistically significant outlier will vary depending on the total number of pairwise comparisons made.

In this work, the main objective was to determine the long-term effect of *Bti* spraying on natural mosquito

populations, such as a global decrease in genetic variability or resistance selection. Using AFLP markers, we first studied the within and among-population genetic diversity of *Ae. rusticus* in five geographical localities of the Rhône-Alpes region comprising both *Bti*-treated and nontreated sites. We then used two outlier detection methods to detect loci under positive selection because of *Bti* treatments.

Material and methods

Study sites

Over-wintering larvae were collected during two consecutive winters (2005 and 2006) in 13 larval sites from five main geographical areas in the Rhône-Alpes region in southeast France (Fig. 1). Samples were taken from both nontreated and treated sites in each area (Fig. 1). Geographic distances between sites ranged from 3.2 to 79.2 km. Seven of the collection sites have been treated with *Bti* for more than 15 years by the regional mosquito control agency and six have never been treated with *Bti*. Because these breeding sites are temporary ponds, most did not have water during both sampling campaigns, so that only two sites were sampled in both years (SMG and Ti). Sampling was performed before the annual larvicidal treatment in spring. At each site, 20–1000 larvae were collected; of these, 20–30 were stored in ethanol until DNA extraction and genotyping while the remainder were used for bioassays with *Bti*. Before toxicological and genetic analyses on the larvae,

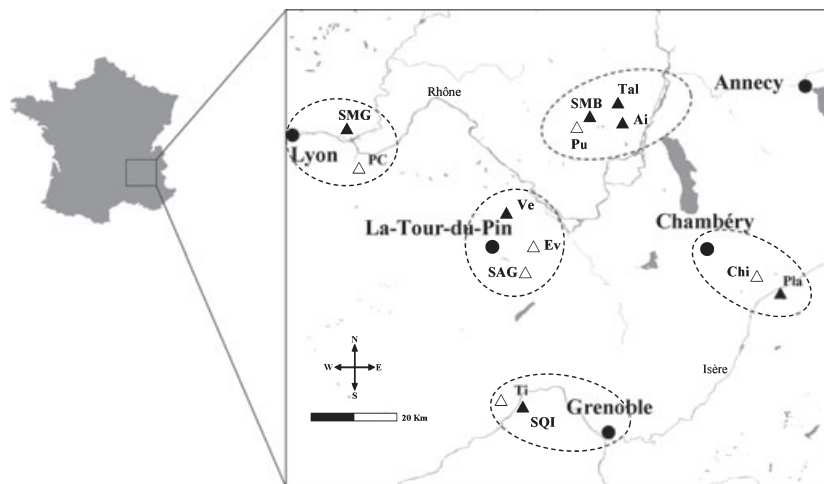


Fig. 1 Geographical distribution of the 13 *Aedes rusticus* populations sampled in the Rhône-Alpes region in southeast France. Populations treated with *Bti* (▲) and nontreated are denoted (△). The different populations are grouped into five main geographical areas (delimited by a dotted line): Lyon area: Saint-Maurice-de-Gourdans (SMG), Pont-de-Chéruf (PC); Grenoble area: Tizin (Ti), Saint-Quentin-sur-Isère (SQI); La-Tour-du-Pin area: Evrieu (Ev), Saint-André-le-Gaz (SAG), Vézeronce (Ve); Chambéry area: Chignin (Chi), Planaise (Pla); Annecy area: Pugieu (Pu), Aignoz (Ai), Tallissieu (Tal), Saint-Martin-de-Bavel (SMB). The names of the main rivers are also indicated.

species were determined using the European mosquito species identification key (Schaffner *et al.* 2001).

Bioassays with *Bti*

For 10 of the 13 sampled sites, the number of larvae collected was sufficient for toxicological analyses in at least one sampling year: Ai (2005), PC (2005), Pu (2005), SAG (2006), SMB (2006), SMG (2005 and 2006), SQI (2005), Tal (2005), Ti (2005 and 2006) and Ve (2005). *Bti* tolerance of each population was tested on larvae the day after sampling. For each population except one (PC), larvae were measured to the nearest 0.5 mm using a graduated binocular microscope to test for correlation between larval size and *Bti* tolerance (de Andrade & Modolo 1991). Mean larval size varied from 5.5 to 11.5 mm across populations.

Groups of 20 larvae were placed in 50 mL of tap water in plastic cups and stored at 10°C. Three concentrations of *Bti* (0.3, 0.5 and 0.7 mg/L; Bactimos® primary powder PP, 10 000 ITU/mg, International Toxic Units, Abbott Laboratories) plus an untreated control were tested. Bioassays were replicated three times (except for site Ti, which was only replicated twice in 2005). Larval mortality was monitored 48 h after exposure to *Bti*; this period allowed sufficient time to reach the mortality plateau (M. Paris, unpublished data). The number of dead larvae per cup was examined by an analysis of variance (Minitab version 12.0; Minitab Inc.) using larval size and *Bti* concentration as covariates, and the sampling year and the *Bti* treatment status of collection sites as fixed effects. Populations were nested within treatment status and considered a random factor.

AFLP genome scan

Total genomic DNA was extracted from larvae with the DNeasy tissue Kit (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. DNA concentration was determined for each sample by spectrometry with a NanoDrop ND-1000 (NanoDrop Technologies) and adjusted to 50 ng/μL.

The AFLP procedure originally described by Vos *et al.* (1995) for plant material is often less successful when applied to animal genomes (Bensch & Akesson 2005). Therefore, this procedure was slightly modified by performing a two-step restriction enzyme digestion, to improve the quality and repeatability of the digestion profiles. Genomic DNA was first digested with *MseI* (150 ng DNA, 1× Buffer NEB2, 1 μg BSA and 2U *MseI* (New England Biolabs) in a 17-μL reaction) and then with *EcoRI* (1× Buffer *EcoRI* and 5U of *EcoRI* (New England Biolabs) in a 27-μL reaction). Restriction reactions

were incubated at 37°C for 2 h 30 min. Specific oligonucleotidic adaptors were then ligated to the end of the restriction fragments with 1U of T4 DNA ligase (New England Biolabs) in a 37-μL reaction containing 1×T4 DNA ligase buffer, 10 pmol of *EcoRI* adaptor and 50 pmol of *MseI* adaptor. The ligation reaction was incubated at 37°C for 2 h 30 min. Preselective and selective amplifications were performed according to Bonin *et al.* (2005). The restriction/ligation mixture was diluted 10 times before the preselective amplification and the preselective amplification product was diluted 20 times before the selective amplification. Two selective PCR primer pairs were selected out of 16 tested, for the quality of the bands produced (i.e. even distribution of bands with relatively homogeneous intensity): E+ATA/M+CAC and E+ACA/M+CAT. Products were separated by electrophoresis on a 3130 ABI capillary automated sequencer (Applied Biosystems). AFLP profiles were then visualized with GeneMapper version 3.7 software (Applied Biosystems) to check for the presence of polymorphic peaks and construct a presence/absence (i.e. 1/0) matrix. The fluorescence intensity threshold for scoring was set at 300 rfu, which generally corresponded to 10% of the size of the highest peak found among all compared individuals. Fragments that could not be scored unambiguously were not included in further analyses. Reproducibility of results was checked by carrying out the whole AFLP protocol twice for 25 individual DNA extracts randomly chosen across populations as recommended by Bonin *et al.* (2004). Repeated samples were randomly distributed during the two electrophoresis runs (one run per primer pair combination). Independence of markers was assessed with their pairwise linkage index $D_{A,B} = 1/n \sum_i |V(A,i) - C(B,i)|$, where $V(A,i)$ and $V(B,i)$ are the allelic values of individual i for markers A and B , respectively, and n is the total number of analysed individuals. Linkage indices were calculated using the program DDM (Disequilibrium between Dominant Markers) version 0.1 (P. Berthier, personal communication, University of Bern).

Population genetic data analysis

Statistical analyses of AFLP patterns were based on the following assumptions: (i) AFLP markers behave as diploid, dominant markers with the allele responsible for the presence of a fragment (i.e. peak) dominant over the allele responsible for its absence; (ii) comigrating fragments represent homologous loci; and (iii) populations are at Hardy–Weinberg equilibrium. A previous analysis performed on *Ae. rusticus* using isoenzyme loci showed that 11 of 22 populations were at Hardy–Weinberg equilibrium (David *et al.* 2003), and no association between treatment status and Hardy–Weinberg

equilibrium was found. Only polymorphic markers were taken into account in the calculations. Mean genetic diversity within populations was assessed with AFLP-SURV (Vekemans 2002) based on two indices: (i) the percentage of polymorphic loci out of all loci ($P\%$); and (ii) the expected heterozygosity averaged across loci, equivalent to Nei's gene diversity (H_j). In AFLP-SURV, estimates of allelic frequencies were computed using a Bayesian method with nonuniform prior distribution of allele frequencies (Zhivotovsky 1999). Genetic differentiation among populations was estimated as the unbiased F_{ST} estimator of Weir & Cockerham (1984), and the 95% confidence interval was obtained by bootstrapping 1000 replicates over loci.

Populations were grouped either by year of sampling, by geographical area or by treatment status and total genetic diversity was partitioned among groups, among populations within groups and within populations, by carrying out a hierarchical analysis of molecular variance (AMOVA) on Euclidian pairwise distances (Φ_{ST}) using Arlequin version 3.0 (Excoffier *et al.* 2005). Significance of the variance components was tested using a nonparametric procedure based on 1000 random permutations of individuals. To test for a correlation between genetic [pairwise $F_{ST}/(1 - F_{ST})$] and geographical distances (in kilometres) between populations, Mantel (1967) tests were performed with R software version 2.5 (R Development Core Team 2005) using 10 000 permutations. We also performed a fine-scale spatial analysis of genetic structure at the individual level using the program SPAGeDI 1.2 (Hardy & Vekemans 2002), which estimates kinship coefficients between all possible pairs of individuals and relates them to the natural logarithm of the geographical distance separating individuals. We tested the significance of the regression slope observed by random permutation of individuals across sites (1000 permutations). We assumed an inbreeding coefficient of zero, but also tested a range of other values up to 1 and it did not change the results (data not shown).

Detection of signatures of positive selection

Outlier loci presenting a signature of positive selection were tracked in our AFLP data set using two different methods. The first was the popular Dfdist program adapted from Fdist (Beaumont & Nichols 1996) for the analysis of dominant data, which is a frequentist method based on summary statistics in a symmetrical island model (i.e. drift-migration equilibrium, Wright 1951). The second method was a new hierarchical Bayesian model-based method first described in Beaumont & Balding (2004). This method has recently been improved by Foll & Gaggiotti (2008) for dominant

markers and is implemented in BayeScan, a program freely available at <http://www-leca.ujf-grenoble.fr/logiciels.htm>. The main advantage of this new approach is that it estimates population-specific F_{ST} coefficients, thereby allowing for different demographic scenarios and different amounts of genetic drift in each population. This method is based on a logistic regression model in which each logit value of genetic differentiation $F_{ST}(i,j)$ for locus i in population j is decomposed as a linear combination of α_i and β_j , corresponding to a locus effect and to a population effect, respectively. To identify adaptive loci, we focused on the posterior distribution of α_i where a positive value suggests that locus i is subject to adaptive selection, whereas a negative value suggests stabilizing selection tending to homogenize allele frequencies over populations. To test for the significance of α_i for each locus i , the posterior probability that α_i is different from zero (i.e. locus i is an outlier) is estimated using a Reversible Jump MCMC algorithm (Foll & Gaggiotti 2008). Priors for α_i and β_j were Gaussian distributions with mean 0 and -2 respectively and standard errors 1 and 1.8 as in Beaumont & Balding (2004). The estimation of model parameters was automatically tuned on the basis of short pilot runs (10 pilot runs, length 2000). Preliminary tests indicated that a burn-in of 10 000 iterations was enough to attain convergence. We used a sample size of 10 000 and a thinning interval of 50, as suggested by Foll & Gaggiotti (2008), resulting in a total length of the chain of 500 000 iterations. Four independent runs were performed to check the consistency between detected outliers. The loci were ranked according to their estimated posterior probability value and all loci with a posterior probability over 95% (or over 99%) were retained as outliers.

The Bayesian approach is less sensitive to false-positive outlier detection than Dfdist, because it takes into account different demographic histories in the studied populations (Beaumont & Balding 2004). However, the Bayesian approach cannot estimate the proportion of false positives (type I error) in detected outliers, because it is not based on hypothesis-testing. It gives a posterior probability for each locus being under selection, without using a predefined threshold. The only way to evaluate the proportion of false positives in a Bayesian approach is to simulate data sets. Using simulated data, Foll & Gaggiotti (2008) showed that its efficiency at detecting true outliers is dependent on the number of populations, the sample sizes and the level of genetic differentiation across populations. In most empirical cases, including ours, the sample sizes and genetic differentiation are too small to allow convergence to be reached in MCMC simulations when performed on only two populations. We therefore first used the Bayesian approach on the whole data set (13 populations), and then Dfdist to perform all

42 possible pairwise comparisons between treated and nontreated populations. Dfdist computes F_{ST} values depending on heterozygosity in a subdivided population (Beaumont & Nichols 1996). Outlier loci were detected by comparing their specific F_{ST} with a null F_{ST} distribution generated with 50 000 simulated loci. The mean target F_{ST} for the null distribution was calculated by excluding 30% of the highest and lowest observed F_{ST} values. Analyses were performed at the 95% and 99% confidence levels. In an attempt to exclude false positive outliers, we retained only those that were detected in at least five pairwise comparisons including at least two independent comparisons (i.e. involving at least four populations). We also used Dfdist on the 13 populations to compare results with the Bayesian approach. Outliers detected by both methods are likely to be truly adaptive regions of the genome, because the two approaches use different algorithms and assumptions. To determine the probability of detecting outliers by chance with BayeScan, we simulated (using the f-swin program, Beaumont & Balding 2004) 100 times 155 neutral loci in 13 populations with an average F_{ST} 0.038 as observed in our populations, and performed BayeScan analysis on each of the 100 randomly generated data sets. Finally, a locus-by-locus AMOVA was performed on the loci detected as outliers to determine whether their inter-treatment variability indeed explains a significant part of variability.

Results

Tolerance of *Aedes rusticus* population to *Bti* toxins

Forty eight hours after exposure to *Bti* Bactimos® powder, larval mortalities ranged from 8.3 to 100% across populations for the intermediate *Bti* concentration (0.5 mg/L) indicating a large variation in tolerance to *Bti* toxins among populations. Analysis of variance showed a significant positive effect of *Bti* concentration and a negative effect of larval size on mortality (Table 1). After testing these two covariates and removing their influence from the analysis, there was no significant effect of sampling year or treatment status of the collection sites on larval mortality (Table 1). Mean (\pm SE) larval mortality at the intermediate *Bti* concentration was 53.9% (\pm 9.8%) and 67.2% (\pm 17.7%) for treated and for nontreated sites, respectively (Fig. 2).

Within-population and within-treatment genetic diversity

A total of 155 polymorphic AFLP markers ranging from 79 to 494 bp in size were successfully scored for 279 individuals using the two primer combinations, with an

Table 1 Analysis of variance of larval mortality. The number of dead larvae after 48 h of exposure to *Bti* was tested against year of sampling (2005 or 2006) and *Bti* site treatment status (treated or nontreated) as fixed effects, and population nested in treatment status as random effect. *Bti* concentration in bioassay tests and larval length were used as covariates

Source	d.f.	SS	MS	F	P
<i>Bti</i> concentration	1	2815.72	2815.72	322.13	<0.0001
Larval length	1	1443.18	368.17	42.12	<0.0001
Sampling year	1	329.48	5.35	0.61	0.436
Site treatment status	1	29.44	45.94	1.7	0.227
Population (treatment)	7	239.2	34.17	3.91	0.001
Error	116	1013.95	8.74		
Total	127	5870.97			

SS, sum of squares; MS, mean squares adjusted for unequal sample size.

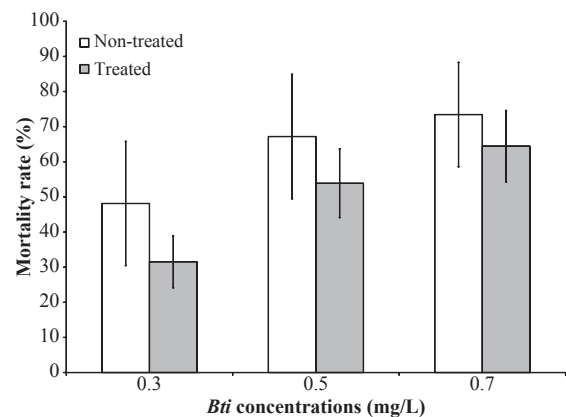


Fig. 2 Larval mortality averaged for treated and nontreated sites for three *Bti* doses. Means and SE per *Bti* dose are presented.

estimated 4.7% genotyping error rate per locus, calculated as the ratio between the observed number of discrepancies and the total number of comparisons (Pompanon *et al.* 2005). All the 279 individuals genotyped presented different profiles. The mean linkage index was 0.5, indicating that the markers were not statistically linked. The percentage of polymorphic loci ($P\%$) and the Nei's gene diversity (H_i) for each population were positively correlated (pairwise Spearman's rank correlation coefficient $r_s = 0.646$; $P = 0.01$). Neither of these two genetic diversity indices was significantly higher for the nontreated sites than the treated ones (Table 2).

Among-population and among-treatment genetic differentiation

When populations were grouped by sampling year, no significant genetic differentiation was detected between

<i>Bti</i> treatment	Population code	Sample size <i>n</i>	No. polymorphic loci	Proportion of polymorphic loci <i>P</i> % (SE)	Nei's gene diversity <i>H_j</i> (SE)
Nontreated	Chi	21	106	68.4	0.164 (0.012)
Nontreated	Ev	12	96	61.9	0.159 (0.013)
Nontreated	PC	20	98	63.2	0.171 (0.013)
Nontreated	Pu	22	115	74.2	0.242 (0.015)
Nontreated	SAG	17	97	62.6	0.183 (0.013)
Nontreated	Ti	36	90	58.1	0.181 (0.014)
			Total: 155	Mean: 64.7 (5.7)	Mean: 0.183 (0.030)
Treated	Ai	21	111	71.6	0.183 (0.013)
Treated	Pla	22	117	75.5	0.208 (0.013)
Treated	SMB	18	89	57.4	0.149 (0.013)
Treated	SMG	33	96	61.9	0.201 (0.014)
Treated	SQI	20	100	64.5	0.162 (0.013)
Treated	Tal	18	104	67.1	0.245 (0.015)
Treated	Ve	19	94	60.6	0.155 (0.013)
			Total: 155	Mean: 65.5 (6.4)	Mean: 0.186 (0.034)

Table 2 Within-population genetic diversity indices for the 13 studied populations

the two groups ($P = 0.117$). Moreover, among-year F_{ST} values for the two populations SMG and Ti, sampled both in 2005 and 2006, were not significantly different from 0 ($F_{ST} = 0.01015$, $P = 0.288$ and $F_{ST} = 0.00233$, $P = 0.432$, respectively). Because no genetic variation was observed between the two sampling years, samples were grouped by site (disregarding the sampling year) for subsequent genetic analyses.

The global F_{ST} value among all populations was 0.036 (95% CI 0.001–0.015; range 0–0.101), indicating low differentiation among populations. However, most of the pairwise F_{ST} were significantly positive (72 of a total of 90 pairwise comparisons). At the regional scale (pairwise distance range 3.2–79.2 km), no correlation between genetic and geographical distances was observed (Mantel test $r = -0.1737$; $P = 0.875$), suggesting that there is no isolation by distance at this scale. For example, population SMG and Pla are 79.2 km apart but show no significant differentiation, while population SMG and PC are only 9 km apart but show a significant F_{ST} . However, at the individual level, there was a weak but significant negative slope (b) between kinship coefficients and distance ($b = -0.0027 \pm 0.00019$ SD, $r^2 = 0.0054$, $P < 0.0001$), suggesting that overall individuals from close locations tended to be more related than individuals from distant locations. Similar results were found for treated and nontreated sites ($b = -0.0035 \pm 0.00025$ SD, $r^2 = 0.016$, $P < 0.0001$ and $b = -0.0022 \pm 0.00037$ SD, $r^2 = 0.0047$, $P < 0.0001$, respectively). The slopes are significantly different: they are stronger among treated than nontreated sites (t -test, $P < 0.01$).

When populations were grouped either by treatment or by geographical area in the AMOVA, most of the genetic variation was observed among individuals within sampling sites (96.28% and 96.12%, respectively). A low but significant differentiation was also observed between sampling sites within groups (4.16% and 4.12%, respectively) whereas there was no differentiation between treated and nontreated sites ($P = 0.879$), or among the five geographical areas ($P = 0.524$).

Signatures of positive selection

Using Dfdist on the 13 populations, 14 (9%) and 6 (3.9%) of the 155 AFLP markers tested were respectively detected at the 95% and 99% confidence levels (Table 3). The hierarchical-Bayesian approach, used on the 13 populations, detected eight AFLP markers (5.2%) of 155 tested with a posterior probability of more than 95%, and 3 (1.9%) markers with a posterior probability of more than 99%. All the outliers detected by the Bayesian approach were also detected by Dfdist. These outliers are likely to be 'true outliers' (i.e. not false positives) because the Bayesian method takes into account the demographic histories of different populations. To link these outliers to *Bti* treatment, Dfdist was used to contrast treated vs. nontreated sites.

Performing all the possible 42 pairwise comparisons between treated vs. nontreated sites, outlier loci were detected in 40 comparisons at the 95% level and in 23 comparisons at the 99% level. For each pairwise comparison performed, a neutral locus has a probability 0.05 (0.01) of being detected as an outlier (type I error);

Table 3 Outliers detection using Dfdist and BayeScan. This table shows the number of outliers detected among the 155 AFLP markers using both Dfdist and the Bayesian inference method for global comparison across the 13 populations, and Dfdist pairwise comparisons between treated and nontreated sites. Only loci above the upper limit of the 95% (and 99%) confidence interval for Dfdist, and those detected with a posterior probability of more than 0.95 (and 0.99) for the Bayesian inference approach were considered as outliers

Outliers detected using Dfdist	No. loci	Detection by the Bayesian analysis	No. loci	Possible inferences
Global analysis (13 populations)	14 (6)	Yes	8 (3)	Consistant outliers
		No	6 (3)	False-positive outliers or demographic effects
Pairwise comparisons				
Observed in less than 5 comparisons	39 (10)	Yes	1 (0)	False-positive outliers
		No	38 (10)	False-positive outliers
Observed in 5 or more dependant comparisons	2 (0)	Yes	2 (0)	Site-specific adaptation
Observed in 5 or more comparisons and in independent comparisons	6 (3)	Yes	5 (3)	<i>Bti</i> treatment selection
		No	1 (0)	Demographic effects

for 42 pairwise comparisons, the number of times such a neutral locus will be detected as an outlier follows a binomial distribution $B(42, 0.05)$ (0.01)). Given this distribution, only those loci identified as outliers in 5(3) or more comparisons are false positive with a risk less than 0.04 (0.008). In total, 47 outliers were detected in at least one comparison at the 95% level (12 at the 99% level). Among them, 39(10) outliers appeared in less than five comparisons and were considered as false positive outliers (Fig. 3). 2(0) outliers appeared in five comparisons, but these comparisons always involved a particular population and were considered to be linked to local, site-specific adaptation unrelated to *Bti* treatment. Finally, 6(3) outliers were detected in five or more comparisons, including at least two independent comparisons ('repeated outliers' as described in Bonin *et al.* 2006 and in Nosil *et al.* 2008).

Two of the eight outliers detected with the hierarchical-Bayesian approach were linked to a specific popula-

tion in pairwise comparisons. These loci are likely to be involved in site-specific adaptation. Finally, 5(3) outliers were detected by both outlier detection programs, indicating a consistent signature of selection to insecticide treatment. Furthermore, these five outliers were not linked because all possible pairs of outlier loci had pairwise linkage index D values ranging from 0.25 to 0.70. These five outliers exhibited a significant differentiation between treatment groups (0.46, 0.306, 0.145, 0.128 and 0.104, respectively), much higher than the differentiation averaged across loci (0.038, nonsignificantly different from 0). Using simulated neutral data sets, only on average (\pm SD) 1.8 (\pm 1.1) and 0.3 (\pm 0.6) outliers were detected with BayeScan with 0.95 and 0.99 posterior probabilities respectively, much less than observed in our data set (eight and three outliers detected respectively).

Discussion

Within-population diversity and among-population differentiation

Most of the genetic variability in this study was found within rather than among *Ae. rusticus* populations. Similar results have been found in many other insect species (including mosquitoes) in studies making use of AFLP markers (Yan *et al.* 1999; Paupy *et al.* 2004; Merrill *et al.* 2005) and more generally with other molecular markers such as allozymes (Urbanelli *et al.* 2000; David *et al.* 2003), microsatellites (Michel *et al.* 2005) or SNPs (Beck *et al.* 2005).

No evidence was found for intense drift and/or selection pressures acting on the global genetic diversity of these populations, even though *Bti* treatment is known

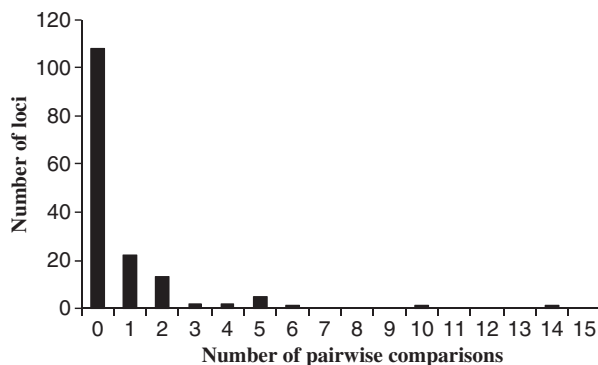


Fig. 3 Histogram showing the number of times individual loci were detected as outliers in pairwise comparisons at the 95% level. Zero indicates loci never detected as outliers.

to kill 90–100% of a mosquito population in the field (Becker 1997). This result contrasts with the decrease in genetic diversity observed in some natural populations exposed to contaminants, e.g. wild yellow perch (*Perca flavescens*) and crab (*Pachygrapsus marmoratus*) populations exposed to heavy metals (Bourret *et al.* 2008; Frattini *et al.* 2008). Such stresses on natural populations can produce various effects on genetic diversity: a decrease in genetic diversity occurs only after strong bottlenecks and in relatively isolated populations (Belfiore & Anderson 2001; Hoffmann & Willi 2008). The fact that we did not observe a decrease in genetic variability in *Ae. rusticus* from treated sites suggests that these are rapidly recolonized by a diversified population of migrants after *Bti* treatment.

The existence of high gene flow across sites is supported by the low overall F_{ST} observed at the regional scale and by the weak isolation-by-distance observed. Interestingly, the isolation-by-distance pattern is more pronounced among treated than nontreated sites, suggesting that there is less dispersal among treated than among nontreated sites. This could be due to the fact that treated populations are likely to be smaller. Furthermore, individuals surviving in treated sites might exhibit lower fitness that could affect their dispersal ability. Together with large population sizes, migration is strong enough to maintain high genetic diversity within all sites. Despite this, most pairwise F_{ST} are significant: the whole region cannot be considered a single panmictic population, but rather as a metapopulation, i.e. a network of populations with their own dynamics, interconnected by migration (Hanski & Gilpin 1991). In some mosquito species, population genetic structure has been described as a network of small and isolated habitat patches with small-scale population structure (Chen *et al.* 2004; Paupy *et al.* 2004; Merrill *et al.* 2005; O'Loughlin *et al.* 2007). For example, in the urban *Aedes aegypti* mosquito, genetic differentiation was shown to occur at distances less than 1 km in the absence of geographic barriers (Reiter *et al.* 1995). In contrast, several mosquito species were shown to exhibit very low genetic differentiation over large distances, or could be considered as a single panmictic unit at a regional scale up to 400 km (Lehmann *et al.* 1997; Beck *et al.* 2005; Wondji *et al.* 2005; Porretta *et al.* 2007).

These differences could be linked to differences in habitat structure (highly fragmented and temporary breeding sites vs. large areas of irrigated rice fields) and to differences in mosquito flying ability. In *Aedes rusticus*, habitat is fragmented (small temporary ponds in forest) and previous studies on flight behaviour suggest that *Aedes rusticus* do not regularly migrate over large distances but stay near their breeding sites, within a radius of 2.5 km (Schafer *et al.* 1997). Our genetic

results show evidence for much larger (active or passive) flying distances than previously suspected in this species.

Furthermore, both spatial distribution and temporal variability in habitat availability influence genetic structure. For example, during a monitoring of the 13 sites for three consecutive years (2005, 2006, 2007), mosquito larvae were found each year in only four sites. Mosquito larvae were present 2 years of three in three sites, and only 1 year in six sites. The absence of *Ae. rusticus* larvae in particular sites was because of the lack of water, revealing the temporary nature of breeding sites in this species. However, eggs of *Aedes* species can live in dried ponds for several years, hatching only when the pond are flooded again (Breeland & Pickard 1967). This long-term persistence of eggs in dried ponds, together with high migration rate, may explain the high genetic diversity observed in all sites, independently of the *Bti* treatments. Therefore, the genetic variability observed within sites may result not only from spatial mixing across differentiated populations, but also from intergenerational genetic admixture. This metapopulation functioning with high level of gene flow between treated and nontreated sites is not favourable for the detection of resistance within sites, although resistance may evolve at the regional scale.

Bti resistance detection

In this context, the lack of differential tolerance to *Bti* observed in the bioassays performed on larvae from treated and nontreated sites is not surprising. Indeed, the spread of an adaptive mutation in populations depends mainly on the strength of the selection pressure and on the intensity of gene flow. For species like *Ae. rusticus*, with large migration rates, long distance dispersal of alleles conferring resistance to susceptible populations is favoured. At a local scale, however, gene flow counteracts changes in allele frequencies caused by natural selection and tends to limit adaptation (Caprio & Tabashnik 1992; Jasieniuk *et al.* 1996; Lenormand 2002; Kawecki & Ebert 2004). In this case, resistance is expected to evolve at a large scale (among treated and nontreated areas), with small differences in resistance between treated and nontreated sites at the regional scale. Further analyses on nontreated and isolated *Ae. rusticus* populations would be necessary to evaluate the resistance level of the Rhône-Alpine populations.

Another explanation for the lack of toxicological evidence for *Bti* resistance in treated sites comes from the fact that the bioassays were performed on G_0 larvae directly collected in the field (because laboratory rearing of this species is not possible) therefore introducing an 'environmental bias' into the measure of *Bti* tolerance.

This study shows that larval size explains a large part of the high variability observed in larval mortality (25%) and highlights the necessity of taking this variable into account when bioassays are performed directly on larvae collected in the field. Other environmental factors, such as food source quality, chemical composition and/or temperature of the water and microbial communities (external and midgut-associated), may have influenced larval physiological state and/or behaviour, inducing uncontrolled mortality variation during bioassays (Lee & Zairi 2005; Lacey 2007). All these factors may prevent the detection of the early evolution of resistance, when differential mortality between resistant and sensitive phenotypes remains weak.

To improve this detection, it would be useful to better standardize bioassays and to use G_1 larvae. However, using G_1 larvae is not possible with *Ae. rusticus* because its life cycle is too complex to be entirely reproduced in the laboratory. An alternative method would be to collect eggs in autumn before the flooding of mosquito breeding sites and to hatch and rear them in standardized laboratory conditions before performing bioassays. This should lead to more precise measurements of the differential tolerance of each population to *Bti* toxins. This technique remains a challenge because of the difficulty of collecting eggs in the field and the high diversity of mosquito species laying eggs in these habitats.

Positive selection and *Bti* resistance evolution

The global analysis using Dfdist detected 14 outliers of which only eight were detected by BayeScan. One explanation could be that the Dfdist confidence interval cannot be directly compared with the BayeScan posterior probability. A second explanation is that fewer loci are detected as outliers with the Bayesian approach because it takes into account specific demographic effects in modelling population divergence: it does not detect loci that do not differ more than expected given the particular demographic patterns of the 13 studied populations. Given the metapopulation structure observed at the regional scale, with each population having specific demographic dynamics, the use of a Bayesian approach to detect adaptive loci seems justified.

Another potential bias in outlier detection is the unavoidable presence of comigrating fragments in AFLP data sets that causes overestimation of allele frequencies and underestimation of the degree of differentiation between subpopulations (Koopman & Gort 2004; Gort *et al.* 2006; Caballero *et al.* 2008). These authors have shown that the proportion of selective loci detected by Dfdist is reduced by up to 15% when the number of experimental peaks per profile is about

75–100, which is the range in our AFLP profiles. Therefore, Dfdist probably underestimates the number of loci genuinely under selection. The efficiency of BayeScan to detect true outliers in presence of homoplasy has not been tested so far.

Of the eight loci detected by both methods in the global analyses, seven were also detected as outliers in more than five pairwise comparisons between treated and nontreated sites. This proportion of loci identified as outliers (4.5%) is comparable with the results of several studies tracking outliers in multiple population pairs (mean: 5.8%, reviewed in Nosil *et al.* 2009). Two of the seven outliers were detected in at least five pairwise comparisons but always involving a particular population (SMG): these are likely to be involved in site-specific adaptation. Five were detected in at least five comparisons, including at least two independent comparisons ('repeated outliers'): these are good candidate loci linked to adaptation to *Bti* treatment. The next step would be to validate these outliers by sequencing them, locating their homologues in the *Aedes aegypti* genome and tracking for *Bti*-like toxin resistance candidate genes (Griffitts & Aroian 2005) in their proximity. The ultimate aim of this study was to determine diagnostic mutations linked to *Bti* resistance and to use these for monitoring the evolution of resistance across time and space in natural populations.

Despite the lack of evidence from bioassays for *Bti* resistance in treated sites, 5 loci of 155 were consistently more differentiated than the rest of the genome, both at the global metapopulation scale (BayeScan) and across pairwise comparisons of treated vs. nontreated sites (Dfdist). Because of the complex composition of *Bti*, which is a mixture of four main toxins with different mechanisms of action, acquisition of resistance is likely to involve multiple genes. Therefore, the evolution of detectable resistance is presumably difficult, especially because the synergistic action of the Cyt toxin has the property to mask resistance to Cry toxins in mosquitoes (Wirth *et al.* 1997). These authors have successfully selected high levels of resistance (up to 1000-fold resistance) to separate Cry toxins on a laboratory *Culex quinquefasciatus* strain (Georghiou & Wirth 1997; Wirth *et al.* 1997). These resistant strains also showed two- to three-fold resistance to *Bti* mixture containing Cyt toxin. Although this limited resistance to *Bti* might be too low to be detected in our bioassays, it could be enough to provide a selective advantage to larvae exposed to *Bti* in the field. Furthermore, the *Bti* toxins sprayed in mixture in the environment may show different persistence through time, and the selective pressure experienced by larvae in the field may be quite different from that we imposed in the laboratory using commercial full *Bti* mixture. Another argument supporting this hypothesis

is the finding of highly toxic leaf litter containing *Bti* spores in treated sites (Tilquin *et al.* 2008). An *Ae. aegypti* strain selected with this toxic leaf litter in our laboratory (Boyer *et al.* 2006) showed high levels of resistance to Cry4A and Cry4B (30- and 11-fold resistance respectively) but only limited resistance to *Bti* mixture (two-fold resistance, M. Paris, unpublished results). In light of these results, the adaptive loci we detected might be linked to resistance to one or more Cry toxins rather than to resistance to Cyt toxins. This could also explain why we observed a lack of resistance to the whole *Bti* mixture together with positive signatures of selection linked to treatment. Therefore, it can be hypothesized that the exposure of larvae to these leaf litters containing *Bti* toxins could favour the evolution of resistance to Cry toxins. If occurring in field populations, this resistance to particular *Bti* toxins might represent a 'first step' towards *Bti* resistance in regions treated exclusively with this bio-insecticide.

Acknowledgements

The authors would like to thank the 'Démoustication Rhône-Alpes' (EID) for their help in collecting field mosquito populations and for insecticide treatment data, as well as all the field collectors. They are also grateful to Joëlle Patouraux for her technical assistance with bioassays and to Matthieu Foll for his helpful discussion and comments on an earlier version of this work. This study was supported by a grant to MP, AB and LD from the Région Rhône-Alpes (grants' nos 0501553401 and 0501545401) and by a collaborative grant attributed by the Démoustication Rhône-Alpes.

References

- de Andrade CFS, Modolo M (1991) Susceptibility of *Aedes aegypti* larvae to temephos and *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* in integrated control. *Revista De Saude Publica*, **25**, 184–187.
- Beaumont MA, Balding DJ (2004) Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Molecular Ecology*, **13**, 969–980.
- Beaumont MA, Nichols RA (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences*, **263**, 1619–1626.
- Beck ET, Bosio CF, Geske DA *et al.* (2005) An analysis of gene flow among Midwestern populations of the mosquito *Ochlerotatus triseriatus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **73**, 534–540.
- Becker N (1997) Microbial control of mosquitoes: management of the upper rhine mosquito population as a model programme. *Parasitology Today*, **13**, 485–487.
- Becker N, Ludwig M (1993) Investigations on possible resistance in *Aedes vexans* field populations after a 10-year application of *Bacillus thuringiensis israelensis*. *Journal of The American Mosquito Control Association*, **9**, 221–224.
- Belfiore NM, Anderson SL (2001) Effects of contaminants on genetic patterns in aquatic organisms: a review. *Mutation Research-Reviews in Mutation Research*, **489**, 97–122.
- Bensch S, Akesson M (2005) Ten years of AFLP in ecology and evolution: why so few animals? *Molecular Ecology*, **14**, 2899–2914.
- Bonin A, Bellemain E, Eidesen PB *et al.* (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology*, **13**, 3261–3273.
- Bonin A, Pompanon F, Taberlet P (2005) Use of amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers in surveys of vertebrate diversity. *Molecular Evolution: Producing The Biochemical Data, Part B*, **395**, 145–161.
- Bonin A, Taberlet P, Miaud C, Pompanon F (2006) Explorative genome scan to detect candidate loci for adaptation along a gradient of altitude in the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Biology and Evolution*, **23**, 773–783.
- Bonin A, Ehrich D, Manel S (2007) Statistical analysis of amplified fragment length polymorphism data: a toolbox for molecular ecologists and evolutionists. *Molecular Ecology*, **16**, 3737–3758.
- Bourret V, Couture P, Campbell PGC, Bernatchez L (2008) Evolutionary ecotoxicology of wild yellow perch (*Perca flavescens*) populations chronically exposed to a polymetallic gradient. *Aquatic Toxicology*, **86**, 76–90.
- Boyer S, David JP, Rey D, Lemperiere G, Ravanel P (2006) Response of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae to three xenobiotic exposures: larval tolerance and detoxifying enzyme activities. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **25**, 470–476.
- Boyer S, Tilquin M, Ravanel P (2007) Differential sensitivity to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and temephos in field mosquito populations of *Ochlerotatus cataphylla* (Diptera: Culicidae): toward resistance? *Environmental Toxicology and Chemistry*, **26**, 157–162.
- Breeland SG, Pickard E (1967) Field observations on twenty-eight broods of floodwater mosquitoes resulting from controlled flooding of a natural habitat in the Tennessee Valley. *Mosquito News*, **27**, 343–358.
- Caballero A, Quesada H, Rolan-Alvarez E (2008) Impact of amplified fragment length polymorphism size homoplasy on the estimation of population genetic diversity and the detection of selective loci. *Genetics*, **179**, 539–554.
- Campbell D, Bernatchez L (2004) Generic scan using AFLP markers as a means to assess the role of directional selection in the divergence of sympatric whitefish ecotypes. *Molecular Biology and Evolution*, **21**, 945–956.
- Caprio MA, Tabashnik BE (1992) Gene flow accelerates local adaptation among finite populations – simulating the evolution of insecticide resistance. *Journal of Economic Entomology*, **85**, 611–620.
- Chen B, Harbach RE, Butlin RK (2004) Genetic variation and population structure of the mosquito *Anopheles jeyporiensis* in southern China. *Molecular Ecology*, **13**, 3051–3056.
- Clements AN (1992) *Biology of Mosquitoes, Vol. I: Development, Nutrition, Reproduction*. Chapman & Hall, London/Glasgow/New York/Tokyo/Melbourne/Madras, UK.
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J *et al.* (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 807.

- David JP, Huber K, Failloux AB, Rey D, Meyran JC (2003) The role of environment in shaping the genetic diversity of the subalpine mosquito *Aedes rusticus* (Diptera, Culicidae). *Molecular Ecology*, **12**, 1951–1961.
- David JP, Rey D, Cuany A, Bride JM, Meyran JC (2002) Larvicidal properties of decomposed leaf litter in the subalpine mosquito breeding site. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 62–66.
- Egan SP, Nosil P, Funk DJ (2008) Selection and genomic differentiation during ecological speciation: isolating the contributions of host association via a comparative genome scan of *Neochlamis bebbianae* leaf beetles. *Evolution*, **62**, 1162–1181.
- Excoffier L, Laval G, Schneider S (2005) ARLEQUIN ver. 3.0: an integrated software package for population genetics data analysis. *Evolutionary Bioinformatics*, **1**, 47–50.
- Ffrench-Constant RH, Daborn PJ, Le Goff G (2004) The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends in Genetics*, **20**, 163–170.
- Foll M, Gaggiotti O (2008) A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a bayesian perspective. *Genetics*, **180**, 977–993.
- Fratini S, Zane L, Ragionieri L, Vannini M, Cannicci S (2008) Relationship between heavy metal accumulation and genetic variability decrease in the intertidal crab *Pachygrapsus marmoratus* (Decapoda; Grapsidae). *Estuarine Coastal and Shelf Science*, **79**, 679–686.
- Georghiou GP, Wirth MC (1997) Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Applied and Environmental Microbiology*, **63**, 1095–1101.
- Goldman IF, Arnold J, Carlton BC (1986) Selection for resistance to *Bacillus thuringiensis* subspecies *israelensis* in field and laboratory populations of the mosquito *Aedes aegypti*. *Journal of Invertebrate Pathology*, **47**, 317–324.
- Gort G, Koopman WJM, Stein A (2006) Fragment length distributions and collision probabilities for AFLP markers. *Biometrics*, **62**, 1107–1115.
- Griffitts JS, Aroian RV (2005) Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *BioEssays*, **27**, 614–624.
- Hanski I, Gilpin M (1991) Metapopulation dynamics – brief history and conceptual domain. *Biological Journal of the Linnean Society*, **42**, 3–16.
- Hardy OJ, Vekemans X (2002) SPAGED: a versatile computer program to analyse spatial genetic structure at the individual or population levels. *Molecular Ecology Notes*, **2**, 618–620.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, **34**, 653–665.
- Hoffmann AA, Willi Y (2008) Detecting genetic responses to environmental change. *Nature Reviews Genetics*, **9**, 421–432.
- Jasieniuk M, BruleBabel AL, Morrison IN (1996) The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed Science*, **44**, 176–193.
- Joost S, Bonin A, Bruford MW et al. (2007) A spatial analysis method (SAM) to detect candidate loci for selection: towards a landscape genomics approach to adaptation. *Molecular Ecology*, **16**, 3955–3969.
- Kawecki TJ, Ebert D (2004) Conceptual issues in local adaptation. *Ecology Letters*, **7**, 1225–1241.
- Koopman WJM, Gort G (2004) Significance tests and weighted values for AFLP similarities, based on arabadopsis in silico AFLP fragment length distributions. *Genetics*, **167**, 1915–1928.
- Lacey LA (2007) *Bacillus thuringiensis* serovariety *israelensis* and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal of The American Mosquito Control Association*, **23**, 133–163.
- Lee YW, Zairi J (2005) Laboratory evaluation of *Bacillus thuringiensis* H-14 against *Aedes aegypti*. *Tropical Biomedicine*, **22**, 5–10.
- Lehmann T, Besansky NJ, Hawley WA et al. (1997) Microgeographic structure of *Anopheles gambiae* in western Kenya based on mtDNA and microsatellite loci. *Molecular Ecology*, **6**, 243–253.
- Lenormand T (2002) Gene flow and the limits to natural selection. *Trends in Ecology & Evolution*, **17**, 183–189.
- Li XC, Schuler MA, Berenbaum MR (2007) Molecular mechanisms of metabolic resistance to synthetic and natural xenobiotics. *Annual Review of Entomology*, **52**, 231–253.
- Mantel N (1967) The detection of disease clustering and a generalized regression approach. *Cancer Research*, **27**, 209–220.
- Merrill SA, Ramberg FB, Hagedorn HH (2005) Phylogeography and population structure of *Aedes aegypti* in Arizona. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **72**, 304–310.
- Michel AP, Ingrassi MJ, Schemerhorn BJ et al. (2005) Rangewide population genetic structure of the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Molecular Ecology*, **14**, 4235–4248.
- Nosil P, Egan SP, Funk DJ (2008) Heterogeneous genomic differentiation between walking-stick ecotypes: “Isolation by adaptation” and multiple roles for divergent selection. *Evolution*, **62**, 316–336.
- Nosil P, Funk DJ, Ortiz-Barrientos D (2009) Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology*, **18**, 375–402.
- O’Loughlin SM, Somboon P, Walton C (2007) High levels of population structure caused by habitat islands in the malarial vector *Anopheles scanloni*. *Heredity*, **99**, 31–40.
- Orr HA (2005) The genetic theory of adaptation: a brief history. *Nature Reviews Genetics*, **6**, 119–127.
- Paul A, Harrington LC, Zhang L, Scott JG (2005) Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *Journal of the American Mosquito Control Association*, **21**, 305–309.
- Paupy C, Orsoni A, Mousson L, Huber K (2004) Comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP), microsatellite, and isoenzyme markers: population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Phnom Penh (Cambodia). *Journal of Medical Entomology*, **41**, 664–671.
- Perez C, Fernandez LE, Sun JG et al. (2005) *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 18303–18308.
- Pompanon F, Bonin A, Bellemain E, Taberlet P (2005) Genotyping errors: causes, consequences and solutions. *Nature Reviews Genetics*, **6**, 847–859.
- Poncet S, Delecluse A, Klier A, Rapoport G (1995) Evaluation of synergistic interactions among the CryIVa, CryIVb, and CryIVd toxic components of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* crystals. *Journal of Invertebrate Pathology*, **66**, 131–135.

- Porretta D, Canestrelli D, Bellini R, Celli G, Urbanelli S (2007) Improving insect pest management through population genetic data: a case study of the mosquito *Ochlerotatus caspius* (Pallas). *Journal of Applied Ecology*, **44**, 682–691.
- R Development Core Team (2005) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0; available at: <http://www.R-project.org>.
- Regis L, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF (2001) Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends in Parasitology*, **17**, 377–380.
- Reiter P, Amador MA, Anderson RA, Clark GG (1995) Dispersal of *Aedes aegypti* in an urban area after blood-feeding as demonstrated by rubidium-marked eggs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, **52**, 177–179.
- Rey D, Despres L, Schaffner F, Meyran JC (2001) Mapping of resistance to vegetable polyphenols among *Aedes* taxa (Diptera, Culicidae) on a molecular phylogeny. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, **19**, 317–325.
- Saleh MS, El-Meniawi FA, Kelada NL, Zahran HM (2003) Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie*, **127**, 29–32.
- Schafer M, Storch V, Kaiser A, Beck M, Becker N (1997) Dispersal behavior of adult snow melt mosquitoes in the upper Rhine valley, Germany. *Journal of Vector Ecology*, **22**, 1–5.
- Schaffner F, Angel G, Geoffroy B *et al.* (2001) *Les moustiques d'Europe [The Mosquitoes of Europe]*. CD-ROM, Montpellier, IRD edition.
- Schlötterer C (2003) Hitchhiking mapping – functional genomics from the population genetics perspective. *Trends in Genetics*, **19**, 32–38.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J *et al.* (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **62**, 775.
- Stinchcombe JR, Hoekstra HE (2008) Combining population genomics and quantitative genetics: finding the genes underlying ecologically important traits. *Heredity*, **100**, 158–170.
- Tilquin M, Paris M, Reynaud S *et al.* (2008) Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) in mosquito natural habitats. *PLoS ONE*, **3**, e3432.
- Urbanelli S, Bellini R, Carrieri M, Sallicandro P, Celli G (2000) Population structure of *Aedes albopictus* (Skuse): the mosquito which is colonizing Mediterranean countries. *Heredity*, **84**, 331–337.
- Vekemans X (2002) *AFLP-SURV version 1.0*. Distributed by the author. Laboratoire de Génétique et Ecologie Végétale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M *et al.* (1995) AFLP – a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Research*, **23**, 4407–4414.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. *Evolution*, **38**, 1358–1370.
- Wilding CS, Butlin RK, Grahame J (2001) Differential gene exchange between parapatric morphs of *Littorina saxatilis* detected using AFLP markers. *Journal of Evolutionary Biology*, **14**, 611–619.
- Wirth MC, Georgiou GP, Federici BA (1997) CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **94**, 10536–10540.
- Wirth MC, Walton WE, Delecluse A (2003) Deletion of the Cry11A or the Cyt1A toxin from *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis*: effect on toxicity against resistant *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Journal of Invertebrate Pathology*, **82**, 133–135.
- Wondji C, Simard F, Lehmann T *et al.* (2005) Impact of insecticide-treated bed nets implementation on the genetic structure of *Anopheles arabiensis* in an area of irrigated rice fields in the Sahelian region of Cameroon. *Molecular Ecology*, **14**, 3683–3693.
- Wright S (1951) The genetical structure of populations. *Annals of Eugenics*, **15**, 323.
- Yan G, Romero-Severson J, Walton M, Chadee DD, Severson DW (1999) Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology*, **8**, 951–963.
- Zhivotovsky LA (1999) Estimating population structure in diploids with multilocus dominant DNA markers. *Molecular Ecology*, **8**, 907–913.

M.P. performed this study during her PhD on insecticide resistance in mosquitoes. She is interested in population genetics, molecular adaptation and evolution. S.B. studies ecotoxicology and insect resistance to xenobiotics. A.B.'s research focuses on understanding the genetic basis of adaptation in various biological models. A.C. is interested in mosquito ecology and evolution. J.P.D.'s research focuses on molecular ecology and adaptive mechanisms in insects, including adaptation of mosquitoes to xenobiotics and insecticide resistance. L.D.'s main research interests are in adaptive patterns in natural populations and underlying evolutionary processes.

Discussion globale et perspectives

Les objectifs de ma thèse étaient tout d'abord de caractériser la rémanence du *Bti* dans l'environnement et notamment son impact sur la résistance des larves de moustiques aux toxines de *Bti* en sélectionnant une souche d'*Aedes aegypti* au laboratoire. J'ai ensuite cherché à caractériser les bases génétiques de la résistance au *Bti* en utilisant plusieurs méthodes de génomique et de transcriptomique sur cette population sélectionnée en laboratoire et sur des populations naturelles Rhône-alpines d'*Aedes rusticus* traitées depuis plusieurs années avec des formulations commerciales de toxines de *Bti*.

I- La rémanence du *Bti* dans l'environnement

I.1- Impact du Bti commercial sur les écosystèmes

Si la bactérie *Bacillus thuringiensis* est généralement considérée comme très peu compétitive dans les milieux naturels, il a été démontré dans certains sites de la région Rhône-Alpes que **le *Bti* commercial utilisé pour la démoustication pouvait proliférer, s'accumuler** et entraîner une toxicité larvaire des litières végétales en décomposition dans les gîtes à moustique plusieurs mois après traitement (chapitre 1). En plus de sa prolifération dans des gîtes larvaires traités, le *Bti* semble **diffuser spatialement dans l'environnement** car l'ADN de bactéries issues de souches commerciales utilisées pour les traitements a été détecté dans plusieurs sites de la région Rhône-Alpes qui n'avaient jamais été traités avec du *Bti*. L'utilisation d'engins aériens pour une pulvérisation de *Bti* à grande échelle pourrait favoriser la contamination accidentelle de sites même relativement éloignés de la zone traitée, par transport aérien des spores contenues dans la poudre de *Bti* pulvérisée. A l'heure actuelle, la bibliographie sur la rémanence du *Bti* dans l'environnement suggère un impact écologique mineur dans les sites où il est utilisé. Néanmoins, le contexte réglementaire récent qui impose une utilisation quasi exclusive de ce bactério-insecticide ainsi que nos résultats suscitent des interrogations concernant l'impact à moyen terme du *Bti* dans les écosystèmes.

En France, comme dans de nombreux pays, les formulations commerciales de *Bti* utilisées pour la démoustication contiennent non seulement les cristaux toxiques produits par la bactérie mais également des spores de cette bactérie. Ces spores permettent de prolonger

l'activité insecticide du *Bti* lorsqu'elles peuvent germer dans le corps des larves et reproduire un cycle de production de toxines. Afin de limiter les contaminations accidentelles de sites non traités, ou la prolifération de bactéries dans l'environnement après épandage de spores, il serait envisageable d'inactiver les spores contenues dans les formulations commerciales. C'est ce qu'a choisi l'Allemagne où les formulations de *Bti* sont irradiées aux rayons gamma pour **limiter le nombre de spores viables épandues dans l'environnement** (Thiery et al. 1996).

I.2- Impact de la rémanence du Bti sur la résistance des larves de moustique

Afin d'étudier l'impact de la rémanence du *Bti* dans l'environnement sur les larves de moustique, j'ai sélectionné pendant de nombreuses générations une souche de laboratoire d'*Ae. aegypti* avec des litières végétales contenant des toxines de *Bti* (chapitre 2). Les résultats ont montré une augmentation très faible de la résistance au *Bti* après 18 générations de sélection. Cependant, la souche sélectionnée montre **des taux de résistance élevés (jusqu'à 30 fois) pour 3 des 4 toxines du Bti** testées séparément. L'accumulation de *Bti* dans l'environnement permet donc de sélectionner très rapidement des résistances aux toxines du *Bti*.

Ces résultats montrent aussi que pour identifier l'apparition de mécanismes de résistance au *Bti* dans les populations naturelles, il est important de tester non seulement les formulations commerciales de *Bti* contenant toutes les toxines, mais également chacune des toxines séparément. Des signatures de sélection liées au traitement au *Bti* ont aussi été détectées dans les populations d'*Ae. rusticus* de la région Rhône-Alpes (chapitre 5) et il serait intéressant de tester la sensibilité de ces populations aux toxines séparées du *Bti*. Cependant, comme la production des toxines individuelles du *Bti* est longue et parfois fastidieuse, ces tests de sensibilité ne pourront pas être appliqués de manière similaire sur un grand nombre d'espèces de moustique la région Rhône-Alpes, comme c'est le cas actuellement pour les tests de sensibilité au *Bti* commercial. Le développement d'un test diagnostique simple permettant aux agences de démoustication d'évaluer de manière rapide et fiable la tolérance des populations naturelles de moustiques aux toxines séparée du *Bti* apparaît cruciale afin d'étudier et de prédire l'apparition de phénomènes de résistance au *Bti*.

I.3- Quels sont les facteurs environnementaux à l'origine de cette rémanence ?

La prolifération et l'accumulation du *Bti* n'ont été mises en évidence que dans certains sites de la région Rhône-Alpes. Les gîtes à moustiques de la région où ces mécanismes ont été identifiés présentent des similarités écologiques : ce sont des marres temporaires localisées dans des sites boisés, ombragés, et contenant une épaisse litière végétale composée principalement de feuilles de chêne, d'aulne et de peuplier. Il est important de mieux comprendre pourquoi et comment ces phénomènes apparaissent dans certains sites :

- Quels sont les facteurs écologiques, biotiques (structure des populations microbiennes, insectes disponibles dans le milieu) ou abiotiques (nature du sol, de la végétation, pH du milieu, facteurs climatiques, cycles de mise en eau des gîtes), qui favorisent cette rémanence dans les milieux naturels ?
- Pourquoi les spores et les toxines n'ont-elles pas subi une inactivation et une dégradation rapide comme cela est observé communément après les traitements ?
- Quelle est la fréquence de ces événements de prolifération du *Bti* dans les milieux naturels ?
- Ces mécanismes peuvent-ils se produire dans des régions à risque sanitaire important comme la Camargue ou bien les départements et territoires d'outre mer ?

Dans ce contexte, il apparaît important d'être en mesure de **suivre le devenir du *Bti* et de ses toxines dans les gîtes larvaires français**. Des outils moléculaires permettant de détecter et de quantifier l'ADN de *Bti* dans l'environnement (PCR diagnostiques et PCR quantitative) ont récemment été développés au laboratoire et permettront de suivre avec précision la prolifération de ces bactéries dans l'environnement.

I.4- Composition des litières toxiques

Pouvoir **quantifier les toxines de *Bti* présentes dans l'environnement** est également un enjeu majeur pour connaître la nature de la pression de sélection exercée sur les populations de moustique et prévoir l'évolution de la résistance aux toxines du *Bti*. En effet, le principal atout du *Bti* est qu'il est composé de plusieurs toxines agissant simultanément par des mécanismes différents et complémentaires, limitant ainsi la probabilité d'apparition de la résistance à cet insecticide. Cependant, si certaines toxines sont préservées dans les litières

végétales en décomposition tandis que d'autres sont dégradées, l'apparition de résistances aux toxines présentes dans ces litières serait alors plus rapide dans les populations de moustiques exposées. Chez la souche d'*Ae. aegypti* sélectionnée aux litières toxiques contenant des toxines de *Bti* (souche LiTOX), des taux de résistance différents ont été mesurés pour **le *Bti* commercial et les litières toxiques, suggérant une différence de composition en toxine** entre ces deux types de matrices toxiques. La souche LiTOX ayant développé une résistance aux trois toxines Cry testées (Cry4A, Cry4B et Cry11), certaines de ces toxines semblent donc conservées dans les litières. Bien qu'un faible niveau de résistance à la toxine Cyt1A a été sélectionnée chez la souche LiTOX, cette toxine a été détectée par anticorps spécifiques dans les litières toxiques utilisées pour la sélection et semble donc également présente. Cependant, une plus faible quantité de cette toxine Cyt1A dans les litières pourrait expliquer l'apparition rapide de la résistance aux toxines Cry. La mise en place d'outils diagnostiques comme des tests immunologiques ELISA permettrait de quantifier précisément chacune des toxines du *Bti* dans l'environnement et d'évaluer leur dégradation différentielle au cours du temps.

II- Quel modèle biologique pour l'étude de la résistance au *Bti* ?

Le choix d'un modèle biologique adapté est primordial pour étudier la résistance au *Bti*. Tout d'abord, la résistance peut être mesurée directement sur le terrain et étudiée dans **les populations naturelles traitées avec cet insecticide**. Cette stratégie offre l'avantage de tenir compte d'une part de l'effet de la pression de sélection réellement exercée par le *Bti* lors des traitements, et d'autre part des facteurs biologiques (flux de gènes entre populations, mode de reproduction) et écologiques (historique des traitements et autres pressions de sélection) influant sur son évolution. Cependant le fait que des niveaux élevés de résistance n'aient pas encore été détectés dans les populations naturelles de moustiques traitées au *Bti*, se limiter à cette approche ne semble pas judicieux.

Une autre stratégie consiste à obtenir par sélection au laboratoire une résistance au *Bti* chez **des espèces modèles** exposées à chaque génération à de fortes doses d'insecticide. La sélection au laboratoire permet d'obtenir et d'étudier la résistance rapidement et bien avant que celle-ci n'apparaisse en populations naturelles. Ce travail en laboratoire facilite également la mise au point d'outils pour étudier la résistance au *Bti* chez les espèces de terrain. Un des

principaux avantages de travailler sur des espèces modèles, est le grand nombre de ressources génétiques disponibles (génomme séquencé et annoté, puces à ADN, marqueurs moléculaires, etc.). De plus, sélectionner une souche résistante au laboratoire permet de connaître et de contrôler de nombreux facteurs environnementaux (absence d'autres pressions de sélection), biologiques (migration, nombre de générations) et démographiques (histoire démographique, influence de la dérive génétique) ayant une influence sur les mécanismes adaptatifs en jeu.

La bibliographie montre que certaines études **combinent les deux approches** en sélectionnant au laboratoire des populations de moustiques récoltées sur le terrain (Goldman et al. 1986). Les populations choisies sont souvent des populations traitées depuis plusieurs années ou montrant déjà une baisse de sensibilité pour l'insecticide étudié. Cette méthode est particulièrement intéressante pour les espèces pour lesquelles l'élevage au laboratoire est réalisable (*Ae. aegypti*, *An. gambiae* ou *Culex pipiens* par exemple), mais ne peut s'appliquer à la plupart des espèces de moustiques de la région Rhône-Alpes comme *Ae. rusticus* qui nécessitent des conditions d'élevage trop contraignantes.

Dans le cadre de l'étude de la résistance au *Bti*, il serait intéressant de comparer les résultats obtenus en populations naturelles avec ceux obtenus sur les souches de laboratoire pour déterminer si :

- l'évolution de la résistance aux toxines du *Bti* prédite en laboratoire est observée sur le terrain
- les mêmes régions du génome sont sous sélection en laboratoire et sur le terrain
- les mêmes gènes et/ou mécanismes sont impliqués dans la résistance au *Bti*.

III- La résistance aux toxines du Bti

III.1- Apparition rapide d'une résistance aux toxines Cry

Une résistance aux toxines Cry du *Bti* est apparue chez la souche LiTOX en seulement quelques générations de sélection avec des litières toxiques contenant des toxines de *Bti*. Les niveaux de résistance ont atteint 30 fois pour la toxine Cry4A après seulement 18 générations de sélection. Plus récemment (après 23 générations de sélection), la souche LiTOX a montré des niveaux de résistance de plus de 50 fois aux toxines Cry4A et Cry4B, indiquant que la résistance n'est pas encore fixée et continue à augmenter chez cette souche de laboratoire. La souche d'*Ae. aegypti* Bora-Bora utilisée pour la sélection est considérée comme « sensible »

et ne possède donc *a priori* pas de modifications des protéines ciblées par les insecticides apparues par mutation en milieu naturel. Par exemple, la mutation *kdr* conférant la résistance aux insecticides organochlorés et pyréthriinoïdes n'est pas présente chez cette souche. Dans notre cas, l'apparition rapide de la résistance au *Bti* laisse supposer que la sélection a agit sur des allèles déjà présents chez la souche Bora-Bora plutôt que sur de nouvelles mutations. La présence en faible fréquence d'allèles de résistance aux toxines du *Bt* a déjà été mise en évidence dans des populations de Lépidoptères et de Coléoptères non exposées à cet insecticide (Gould et al. 1997, Wenes et al. 2006). De plus, comme la résistance aux toxines du *Bti* peut impliquer de nombreux mécanismes et de nombreux gènes, la probabilité de posséder un des allèles de résistance à ces toxines pourrait s'en trouver favorisée. Il est vraisemblable que certains allèles conférant une résistance accrue aux toxines du *Bti* soient présents chez la souche sensible et que des combinaisons alléliques particulières ont été sélectionnées chez la souche LiTOX comme l'illustre les analyses AFLP (analyses PCoA, voir chapitre 3). Lorsque la/les mutation(s) responsable(s) de la résistance au *Bti* seront clairement identifiées chez la souche LiTOX, il deviendra alors possible de vérifier si ces mutations étaient déjà présentes chez la souche sensible parente ou bien si elles sont apparues au cours du processus de sélection.

III.2- Mécanismes potentiellement impliqués dans la résistance au Bti chez la souche LiTOX

La souche LiTOX a développé des niveaux de résistance relativement élevés aux toxines Cry du *Bti*, mais montre un niveau de résistance très faible à la toxine Cyt1A et au *Bti* commercial contenant le mélange des toxines. Il a été montré que les toxines Cyt ont la particularité de s'insérer directement dans les membranes des cellules épithéliales sans nécessiter de récepteurs spécifiques (Butko et al. 2003, Manceva et al. 2005). De plus, la boucle $\beta 6$ - αE de la toxine Cyt1A peut se fixer à trois boucles du domaine II de la toxine Cry11A ($\alpha 8$, $\beta 4$ and loop 2), et, lorsqu'elle est insérée dans les membranes, peut agir comme un récepteur pour Cry11A (Perez et al. 2005, Perez et al. 2007). Ainsi, il semble que cette capacité de la toxine Cyt1A permette à la fois d'augmenter le nombre de récepteurs membranaires aux toxines Cry et de réduire la résistance aux toxines Cry lorsque celle-ci implique une modification des récepteurs membranaires. Dans le cas de la souche LiTOX, la résistance aux toxines Cry est masquée en présence de la toxine Cyt1A, suggérant que les mécanismes de résistance à ces toxines pourraient impliquer **une modification de leurs**

récepteurs membranaires. De plus, comme un faible niveau de résistance persiste pour le *Bti* commercial contenant la toxine Cyt1A, la résistance de la souche LiTOX pourrait également impliquer d'autres mécanismes additionnels, comme la modification métabolique de l'activation des protoxines. Ces hypothèses restent très spéculatives à ce stade de l'étude et des expérimentations supplémentaires seront nécessaires pour identifier clairement les mécanismes impliqués. Par exemple, pour tester l'implication potentielle d'une altération de l'activation des protoxines par des protéases du tube digestif, il apparaît possible de comparer la sensibilité des larves des souches LiTOX et sensible exposées soit aux toxines Cry non activées, soit aux mêmes toxines préalablement activées *in vitro*. Ce type d'expérimentation est actuellement en cours au laboratoire dans le cadre de la thèse de Guillaume Tetrau.

III.3- Résistance croisée entre les toxines du Bti

Environ 25% des individus de la souche LiTOX montrent un allongement de 5 jours de leur temps de développement larvaire. Ces individus présentent une résistance aux toxines Cry4B et Cry11A, mais ne présentent pas de résistance à la toxine Cry4A. Ce résultat semble indiquer une absence de résistance croisée entre les toxines Cry4B et Cry4A chez ces individus, c'est-à-dire que le mécanisme de résistance leur permettant de résister à Cry4B ne leur permettrait pas de résister à la toxine Cry4A, et que deux mécanismes distincts pourraient donc conférer une résistance à ces deux toxines. Afin de confirmer ce résultat il serait intéressant de sélectionner de façon indépendante une résistance à chacune de ces toxines chez des souches distinctes et de vérifier ensuite par bioessais les niveaux de résistances croisées avec chacune des toxines du *Bti*. S'il est confirmé, ce résultat implique que plusieurs mécanismes de résistance ont été sélectionnés chez la souche LiTOX et que **la résistance au Bti est d'origine multigénique**. Enfin, d'un point de vue appliqué, une absence de résistance croisée entre les toxines Cry4A et Cry4B chez cette espèce pourrait constituer un élément supplémentaire permettant d'expliquer l'évolution limitée de la résistance au *Bti* dans les populations naturelles.

III.4- Coûts et compromis adaptatifs

Des coûts associés à la résistance ont été mis en évidence chez la souche LiTOX résistante aux toxines de *Bti* (chapitre 4). Ces coûts s'expriment par une réduction de la survie des œufs, un allongement du temps de développement larvaire et une baisse

importante de la fécondité des femelles adultes. Des coûts élevés liés à la résistance au *Bti* offrent la possibilité de mettre en place des stratégies de traitement comme la stratégie « haute-dose-refuge » qui préconise une application localisée du pesticide en laissant des parcelles « refuges » non traitées à proximité. Le succès de cette stratégie dépend de la supériorité compétitive des individus sensibles dans les zones non traitées et de leur diffusion vers les zones traitées, ayant pour effet la diminution de la fréquence de l'allèle de résistance non seulement dans les refuges, mais également dans les zones traitées (Lenormand & Raymond 1998). Cette stratégie a prouvé son efficacité pour limiter l'évolution de la résistance au Bt chez des ravageurs de cultures lors de l'utilisation de cultures transgéniques exprimant des gènes codant des toxines du *Bt* (Liu & Tabashnik 1997, Vacher et al. 2003, Kumar et al. 2008). Cependant elle ne peut être appliquée avec succès que lorsque les allèles de résistance sont encore en fréquence faible dans les populations. Dans le cas de la résistance au *Bti* chez les moustiques de terrain, la résistance n'étant pas documentée, il est vraisemblable que les allèles de résistance soient en fréquence faible. La prise de conscience que la résistance peut évoluer devrait inciter les gestionnaires à adopter une stratégie d'épandage du *Bti* localisée, permettant le maintien de populations d'individus sensibles à proximité des zones traitées (zones refuges). De plus, compte-tenu des résultats obtenus sur des litières provenant de sites a priori non traités, mais contenant néanmoins des spores viables de *Bti* commercial, toutes les précautions devraient être apportées afin d'éviter la contamination accidentelle des zones refuges. Par exemple, privilégier l'épandage terrestre plutôt qu'aérien, et/ou utiliser du *Bti* préalablement irradié.

IV- Etude des bases génétiques de la résistance au *Bti* par scans génomiques

Tout d'abord, les régions génomiques impliquées dans la résistance au *Bti* ont été recherchées par une **approche de génomique des populations**. Contrairement aux approches fonctionnelles qui cherchent à identifier des protéines fixant, dégradant ou activant les toxines du *Bti*, avant d'identifier les gènes correspondants puis la/les mutation(s) impliquée(s) dans la résistance, l'approche par génomique des populations consiste à comparer des populations de génomes soumises à des pressions de sélection contrastées afin de rechercher les gènes sélectionnés. L'intérêt de cette approche est de s'affranchir de tout *a priori* sur le ou les gènes

impliqués dans la résistance, et d'étudier l'impact de la sélection sur le génome dans sa globalité. C'est une approche particulièrement utile dans le cas d'une résistance impliquant un grand nombre de gènes de fonctions mal connues. Dans notre cas, la stratégie a consisté à rechercher à l'aide de centaines de marqueurs génétiques des signatures de sélection positive dans les génomes de populations de moustiques résistantes au *Bti* (souche de laboratoire d'*Ae. aegypti* sélectionnée) ou traitées depuis plus de 15 ans au *Bti* (espèce de terrain *Ae. rusticus*). Pour cela deux scans génomiques ont été effectués pour l'espèce de laboratoire *Ae. aegypti* (l'un avec les marqueurs AFLP répartis aléatoirement dans le génome et l'un à l'aide de marqueurs DArT liés à un élément transposable), et un scan génomique AFLP a été effectué pour l'espèce *Ae. rusticus*.

IV.1- Détection et localisation dans le génome des signatures de sélection positive détectées par scans génomiques

Pour chacun des génomes scans effectués, des signatures de sélections ont été détectées pour plusieurs marqueurs ayant un comportement hors-norme (« *outlier* »): 18 (4.17 % des marqueurs) et 6 (4.5 %) loci *outliers* AFLP pour les scans génomiques effectués sur les espèces *Ae. aegypti* et *Ae. rusticus* respectivement, et 70 (14.5%) loci *outliers* DArT détectés chez *Ae. aegypti*. Cette proportion de loci *outliers* potentiellement liés à la résistance ou aux traitements avec le *Bti* est comparable à la proportion de 5.8 % de loci *outliers* détectés généralement par les scans génomiques visant à étudier d'autres pressions de sélection (Nosil et al. 2009). La détection de loci *outliers* anonymes (c'est-à-dire de séquence et de position sur le génome inconnues) était jusqu'à présent une des limites des scans génomiques. Aujourd'hui **l'accès aux séquences des loci *outliers*** est facilité par l'utilisation de nouvelles méthodologies comme celle des DArT (clonage des marqueurs), ou bien par les avancées récentes en matière de séquençage d'ADN à haut débit comme par exemple le pyroséquençage.

Un des avantages conféré par l'utilisation d'espèces modèles dont le génome est séquencé comme *Ae. aegypti* est de pouvoir localiser de façon précise sur le génome les marqueurs *outliers* séquencés. En revanche, pour l'espèce *Ae. rusticus*, aucune donnée de séquence n'est encore disponible. En se basant sur la synténie existant entre les génomes d'*Ae. aegypti* et d'*Ae. rusticus*, il est parfois possible de positionner sur le génome de l'espèce modèle une partie des loci *outliers* détectés chez l'espèce non modèle. Dans notre cas, les

séquences des loci *outliers* AFLP d'*Ae. rusticus* obtenues par pyroséquençage étaient composées principalement de séquences répétées dans le génome d'*Ae. aegypti* et n'ont donc pas pu être localisées précisément sur le génome de référence. Les éléments répétés des génomes peuvent poser de réels problèmes pour l'analyse génétique de certaines espèces ainsi que pour le séquençage et l'assemblage de leur génome. Par exemple, le génome d'*Ae. aegypti* est composé d'environ 50 % de séquences répétées (Nene et al. 2005), et des mesures préliminaires de quantité d'ADN par cytométrie de flux indiquent que le génome d'*Ae. rusticus* est environ 2,5 fois plus grand (Vieira C, communication personnelle), et donc potentiellement composé d'une proportion encore plus élevée d'éléments répétés que le génome d'*Ae. aegypti*.

Chez l'espèce *Ae. aegypti*, le séquençage de 8 loci *outliers* AFLP et 42 loci *outliers* DArT et leur localisation dans le génome séquencé de cette espèce ont permis de déterminer que la plupart des loci *outliers* **ne colocalisent pas** dans la même région du génome. Des signatures de sélection positives sont donc détectées dans de nombreuses régions du génome, indiquant que la résistance est probablement **complexe et d'origine multigénique**. Sur le total des 50 loci *outliers* séquencés, seulement 2 *outliers* DArT sont localisés dans la même région du génome d'*Ae. aegypti* (le même supercontig) tandis que les autres sont répartis sur 48 des 4758 supercontigs assemblés pour cette espèce. Ne pas trouver plus de marqueurs qui colocalisent n'est pas étonnant d'un point de vue statistique, car les 900 marqueurs génétiques utilisés pour ces analyses représentent seulement 20 % du nombre total des supercontigs et les 50 loci *outliers* séquencés seulement 1 %. Un assemblage de ces supercontigs ou l'obtention d'une carte génétique grâce à une approche QTL par exemple, seraient d'une grande utilité pour pouvoir déterminer plus précisément le nombre de régions du génome sous sélection.

IV.2- Origine des signatures de sélection détectées par les scans génomiques

Les signatures de sélection détectées par les méthodes de scans génomiques peuvent avoir de nombreuses origines.

Premièrement, les méthodes statistiques utilisées pour l'analyse des données peuvent détecter des loci neutres comme étant des *outliers*, ce sont les « **faux positifs** ». La comparaison de plusieurs populations avec plusieurs méthodes d'analyse statistiques permettant la détection des loci *outliers* permet de limiter le nombre de faux positifs (Bonin et al. 2004, Nosil et al. 2008).

Deuxièmement, la **dérive génétique** peut être caractérisée par la même signature génétique que la sélection, c'est-à-dire une baisse de la diversité génétique (Hamblin et al. 2006). Connaître l'histoire démographique des populations étudiées est donc très utile pour pouvoir estimer les effets potentiels dus à la dérive. Afin de limiter ce biais, il est possible d'utiliser la méthode de détection d'*outliers* récemment développée par Foll & Gaggiotti (2008) au laboratoire et qui à l'avantage de prendre en compte l'histoire démographique des populations testées. L'effet de la dérive génétique est accentué par de faibles effectifs dans la population, ce qui peut parfois être le cas lorsque l'on sélectionne une souche en laboratoire.

Troisièmement, les **différences de taux de mutation** entre les différents éléments du génome peuvent également se confondre avec des signatures de sélection lors des scans génomiques. Par exemple, en comparant les souches sensible et résistante de l'espèce *Ae. aegypti*, nous avons pu mettre en évidence des indices de différenciation (F_{ST}) très élevés pour les marqueurs liés à un élément transposable ($F_{ST} = 0.556$) par rapport à des marqueurs AFLP neutres répartis aléatoirement sur le génome ($F_{ST} = 0.114$). En conséquence, un marqueur AFLP se situant par hasard dans un élément transposable ou bien tout autre portion génomique caractérisée par une forte diversité génétique montrera alors un F_{ST} plus élevé que la moyenne des autres marqueurs AFLP et pourra donc être détecté comme « *outlier* ». Bien que les éléments transposables semblent fréquemment impliqués dans les phénomènes d'adaptations rapides (Aminetzach et al. 2005, Yang et al 2007), les détecter de manière récurrente lors de scans génomiques ne suffit donc pas à leur attribuer un rôle majeur dans les processus adaptatifs étudiés.

Quatrièmement, les signatures de sélection peuvent bien sur être liées **aux gènes impliqués dans la résistance au *Bti***. Trois cents gènes candidats codant principalement pour des récepteurs aux toxines du *Bti* ou pour des protéases impliquées dans leur activation ou leur dégradation ont été identifiés dans le génome d'*Ae. aegypti*, une de nos hypothèses étant que la sélection agit principalement sur un ou plusieurs de ces gènes. Des signatures de sélection peuvent également être liées à de nombreux **autres traits ayant un impact mineur sur la résistance** aux toxines du *Bti* (comportement alimentaire, développement, métabolisme, morphologie, etc.).

Cinquièmement, la sélection peut agir également sur des gènes permettant la **compensation du coût de la résistance**. Bien qu'ils jouent un rôle important dans les phénomènes d'adaptation, les effets pléiotropes et épistasiques entre les gènes restent encore peu connus. La résistance aux pesticides est un bon modèle pour déterminer le nombre de traits et de gènes interagissant avec un allèle adaptatif ainsi que la nature de ces interactions. Il a été démontré par exemple qu'un allèle de résistance à un herbicide pouvait interagir avec de nombreux traits d'histoire de vie chez la plante modèle *Arabidopsis thaliana*, et que la présence ou l'absence de ces interactions dépendait du fond génétique des plantes testées (Paris et al. 2008). Dans ce contexte, il serait intéressant de comparer le génome des individus de la souche d'*Ae. aegypti* résistante au *Bti* montrant une réduction des coûts liés à la résistance avec des individus exprimant ces coûts afin d'identifier les gènes impliqués dans la compensation de ces coûts.

Enfin, la sélection en laboratoire peut parfois entraîner la **sélection accidentellement d'autres traits** liés par exemple à la méthode de sélection utilisée ou bien aux conditions d'élevage et de manipulation de l'organisme étudié. Dans notre cas, il est possible d'avoir sélectionné des traits liés à une modification du régime alimentaire chez la souche LiTOX partiellement nourrie avec des litières végétales.

IV.3- Identification de gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux toxines du Bti

Parmi les 50 loci *outliers* liés à la résistance au *Bti* séquencés chez l'espèce *Ae. aegypti*, 10 sont localisés dans des supercontigs contenant 1 à 4 gènes candidats à la résistance aux toxines du *Bti*. La probabilité d'obtenir un tel nombre de marqueurs localisés dans un des 169 contigs contenant des gènes candidats par chance est très faible (loi binomiale $B(50, 169/4758)$, $P = 7.34 \text{ E-}06$), ce qui indique que les marqueurs génétiques détectés comme *outliers* lors de nos scans génomiques **sont significativement agrégés avec des gènes candidats**.

Lorsque les régions du génome sous sélection sont identifiées, il est alors particulièrement difficile de choisir quels gènes étudier de manière précise entre les nombreux gènes présents dans ces régions. Tout d'abord, à quelle distance du locus *outlier* un gène doit-il être considéré comme potentiellement impliqué dans la résistance ? En d'autre terme, à

quelle distance du gène sous sélection seront encore détectées des signatures de sélection ? La résistance ayant évolué en seulement quelques générations chez la souche LiTOX, le déséquilibre de liaison est susceptible de s'étendre sur de grandes distances autour des gènes sélectionnés. De tels déséquilibres de liaison offrent l'avantage d'augmenter les chances de détecter les régions du génome sous sélection, mais ont aussi l'inconvénient d'augmenter les nombre de gènes identifiés.

Dans ce contexte, une stratégie intéressante pourrait consister à séquencer en priorité les gènes candidats proches des loci *outliers* comme par exemple ceux codant pour des récepteurs potentiels aux toxines du *Bti*, car des mutations sont attendues dans ces gènes. En ce qui concerne les gènes codant pour des protéases impliquées dans l'activation ou la dégradation des toxines, il est plus probable de trouver des modifications dans les régions de régulation de ces gènes. Pour ces gènes, il apparait donc plus intéressant d'étudier leurs niveaux de transcription par RT-PCR quantitative, puces à ADN ou bien par séquençage à très haut débit de bibliothèques d'ADNc.

IV.4- Séquençage des gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux toxines du Bti

Parmi les gènes proches des loci *outliers* DArT, deux gènes codant pour des récepteurs potentiels des toxines du *Bti* (une cadhérine et une aminopeptidase) ont été séquencés chez 25 individus des souches d'*Ae. aegypti* sensible et résistante. Le gène codant pour la cadhérine est localisé sur le même supercontig que deux *outliers* DArT. Des signatures de sélection positive ont été mises en évidence dans le gène codant cette cadhérine chez la souche résistante, soulignant son rôle potentiel dans la résistance au *Bti*. Inversement, la séquence du gène codant pour l'aminopeptidase ne montre aucune signature de sélection et ce gène ne semble donc pas impliqué dans la résistance au *Bti*. L'absence de signature de sélection dans ce gène situé à environ 1000 kb du locus *outlier* semble indiquer que cette distance du locus *outlier* est trop élevée pour détecter une signature de sélection. Dans certaines régions du génome humain, une baisse de variabilité génétique due à un balayage sélectif a été détectées sur un intervalle de plus de 500 kb (Kelley et al. 2006). Cependant, les effets d'un balayage sélectif dus à la sélection sont souvent restreints à des régions plus limitées. Par exemple, une forte baisse de diversité a été détectée jusqu'à 100 kb autour du gène *dhfr* impliqué dans la résistance à la pyrimidine chez *Plasmodium falciparum* (Nair et al. 2003). De même, des

signatures de sélection étaient détectables à seulement 10 kb ou 20 kb autour de loci microsatellites détectés comme *outliers* lors de scans génomiques chez la littorine ou l'épinoche respectivement (Wood et al. 2008, Makinen et al. 2008).

Dans le cas du gène codant pour la cadherine montrant une signature de sélection, il se situe à 97 kb et 2200 kb respectivement des 2 loci *outliers* colocalisés sur le même supercontig. Néanmoins, la détection de signature de sélection dans le gène codant pour la cadherine ne suffit pas à prouver que la sélection a agi directement sur ce gène. En effet, les gènes candidats séquencés sont proches des loci *outliers* et se trouvent donc dans des régions du génome présentant des signatures de sélection positive. Il n'est donc pas étonnant de détecter les mêmes signatures de sélection dans leurs séquences. Il est donc aussi envisageable que ce gène soit lié à un autre gène sous sélection qui pourrait lui, être impliqué dans la résistance. Il est donc indispensable de confirmer l'implication de ce gène dans la résistance au *Bti* par différentes approches complémentaires. Parmi celles-ci, il est possible d'envisager :

- le séquençage du gène et des régions adjacentes chez de nombreux individus pour déterminer si une mutation diagnostique permet de distinguer les individus de la souche sélectionnée des individus sensibles.
- Une analyse fonctionnelle des capacités de fixation de la protéine et de ses différents allèles avec les toxines du *Bti*.
- Une inhibition de son expression par ARN interférant ou par mutations dirigées.

A l'heure actuelle, aucune mutation diagnostique dans le gène codant pour la cadherine n'a été identifiée entre la souche sensible et la souche résistante. Lors d'adaptations multigéniques, l'hypothèse est que la sélection agit lors des premières générations sur la combinaison des allèles d'intérêt, plutôt que sur leurs fréquences. Cette hypothèse semble s'appliquer à la résistance au *Bti* car les résultats de diversité génétique indiquent que la sélection de la souche LiTOX n'a pas sélectionné seulement des allèles particuliers chez la souche LiTOX, mais surtout de nouvelles combinaisons alléliques non présentes chez la souche d'origine. Il apparaît donc difficile de pouvoir détecter après seulement quelques générations de sélection la fixation des allèles de résistance.

Enfin, la souche LiTOX montre des niveaux de résistance élevés aux 3 toxines Cry4A, Cry4B et Cry11A, et les gènes identifiés par scans génomiques sur cette souche ne peuvent donc pas être attribués à la résistance à l'une de ces toxines en particulier. Il serait intéressant de sélectionner à partir de la souche sensible, et de façon indépendante des souches résistantes à chacune des toxines individuelles du *Bti* afin d'associer les différents gènes potentiellement impliqués dans la résistance aux toxines individuelles du *Bti*.

V- Transcriptomique et recherche des bases génétiques de la résistance au *Bti*

La mise au point de nombreuses puces à ADN ainsi que les avancées technologiques récentes en matière de séquençage à très haut débit permettent aujourd'hui d'étudier de manière globale les variations de transcriptome chez plusieurs espèces de moustiques. Par exemple, le séquençage du transcriptome des souches d'*Ae. aegypti* sensible et résistante avec le séquenceur à très haut débit Solexa nous a permis de comparer l'expression de 6 434 gènes entre ces deux souches. L'avantage de cette méthode est de pouvoir étudier l'ensemble du transcriptome sans *a priori* sur les gènes impliqués dans la résistance au *Bti*. Bien que cette approche ne permette probablement pas de détecter l'ensemble des gènes exprimés chez les larves, plus de **300 gènes ont montré des différences de transcription significatives** chez la souche résistante par rapport à la souche sensible. Une dizaine de gènes candidats codant pour des récepteurs membranaires ou des protéases potentiellement impliquées dans l'activation des toxines montrent une sous-expression significative chez la souche résistante et pourraient donc contribuer à la résistance.

De nombreux gènes non connus ou des régions du génome non annotées comme codantes montrent également des différences d'expression très élevées entre les deux souches. L'annotation lacunaire du génome d'*Ae. aegypti* et le nombre important de gènes de fonction encore inconnue dans le génome des moustiques représentent une limite importante des méthodes de transcriptomique globales. Dans le cadre de notre étude, les résultats obtenus grâce à ce screening à grande échelle devront sans doute être validés et confirmés par d'autres approches moléculaires et fonctionnelles. Enfin, une confrontation globale et systématique

des résultats obtenus par les approches de génomique et de transcriptomique pourrait permettre d'identifier des gènes fortement susceptible d'être impliqués dans la résistance.

VI- Conclusion générale

Le bactério insecticide *Bti*, de part sa spécificité envers les Diptères et de part l'absence d'évidence d'une évolution rapide de la résistance dans les populations naturelles, représente aujourd'hui une très bonne alternative aux insecticides chimiques. Cependant les résultats obtenus au cours de ma thèse montrent que les traitements au *Bti* pourraient avoir dans certains cas un impact important dans les écosystèmes. Il apparaît donc important de mieux connaître le comportement du *Bti* dans les milieux humides, et d'identifier, afin de les prévenir, les risques liés à son utilisation massive pour la démoustication.

De plus, j'ai pu montrer que des niveaux de résistance élevés à certaines de ses toxines peuvent apparaître rapidement chez *Ae. aegypti* en laboratoire. L'étude de la résistance au *Bti* chez des espèces de moustique de laboratoire est importante afin d'identifier les gènes et les mécanismes susceptibles d'être impliqués dans la résistance et notamment les mutations conférant la résistance. Une application à moyen terme de ce travail pourra être la possibilité d'estimer la fréquence des allèles de résistance dans les populations naturelles de moustiques dans des gîtes traités et non traités au *Bti*. La surveillance de la sensibilité au *Bti* des espèces cibles, et la détection précoce de la présence d'allèles de résistance dans les populations naturelles, permettra d'estimer la probabilité d'apparition de phénomènes de résistance et d'en anticiper le risque. Enfin, l'étude du coût de la résistance au *Bti* et d'autres facteurs génétiques comme la dominance des gènes de résistance sera essentielle afin de pouvoir prédire et modéliser la résistance au *Bti* dans les populations naturelles. De tels travaux permettront de mettre en œuvre une gestion intégrée et durable des populations de moustiques combinant l'utilisation de ce bactério-insecticide avec d'autres méthodes de lutte.

Bibliographie

- Abdullah MAF, Valaitis AP, Dean DH (2006) Identification of a *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba toxin-binding aminopeptidase from the mosquito, *Anopheles quadrimaculatus*. *BMC Biochem* **7**, 16.
- Agaisse H, Lereclus D (1995) How Does *Bacillus-Thuringiensis* Produce So Much Insecticidal Crystal Protein. *Journal Of Bacteriology* **177**, 6027-6032.
- Akbari M, Wenzl P, Caig V, *et al.* (2006) Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theoretical And Applied Genetics* **113**, 1409-1420.
- Aminetzach YT, Macpherson JM, Petrov DA (2005) Pesticide resistance via transposition-mediated adaptive gene truncation in *Drosophila*. *Science* **309**, 764-767.
- Andersson DI (2003) Persistence of antibiotic resistant bacteria. *Current Opinion In Microbiology* **6**, 452-456.
- Angus TA (1954) A Bacterial Toxin Paralysing Silkworm Larvae. *Nature* **173**, 545-546.
- Armstrong B, Stewart M, Mazumder A (2000) Suspension arrays for high throughput, multiplexed single nucleotide polymorphism genotyping. *Cytometry* **40**, 102-108.
- Autorino GL, Battisti A, Deubel V, *et al.* (2002) West Nile virus epidemic in horses, Tuscany region, Italy. *Emerging Infectious Diseases* **8**, 1372-1378.
- Bah A, van Frankenhuyzen K, Brousseau R, Masson L (2004) The *Bacillus thuringiensis* Cry1Aa toxin: effects of trypsin and chymotrypsin site mutations on toxicity and stability. *Journal Of Invertebrate Pathology* **85**, 120-127.
- Barrows BD, Griffiths JS, Aroian RV (2006) *Caenorhabditis elegans* carbohydrates in bacterial toxin resistance. *Functional Glycomics* **417**, 340-358.
- Bayyareddy K, Andacht TM, Abdullah MA, Adang MJ (2009) Proteomic identification of *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* toxin Cry4Ba binding proteins in midgut membranes from *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* Linnaeus (Diptera, Culicidae) larvae. *Insect Biochemistry And Molecular Biology* **39**, 279-286.
- Beaumont MA, Balding DJ (2004) Identifying adaptive genetic divergence among populations from genome scans. *Molecular Ecology* **13**, 969-980.
- Beaumont MA, Nichols RA (1996) Evaluating loci for use in the genetic analysis of population structure. *Proceedings of The Royal Society of London Series B-Biological Sciences* **263**, 1619-1626.
- Beck ET, Bosio CF, Geske DA, *et al.* (2005) An analysis of gene flow among Midwestern populations of the mosquito *Ochlerotatus triseriatus*. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **73**, 534-540.
- Becker N, Ludwig M (1993) Investigations On Possible Resistance In *Aedes-Vexans* Field Populations After A 10-Year Application Of *Bacillus-Thuringiensis-Israelensis*. *Journal Of The American Mosquito Control Association* **9**, 221-224.
- Beegle CC, Yamamoto T (1992) Invitation Paper (Cp-Alexander-Fund) - History Of *Bacillus-Thuringiensis* Berliner Research-And-Development. *Canadian Entomologist* **124**, 587-616.
- Benedict MQ, Levine RS, Hawley WA, Lounibos LP (2007) Spread of the tiger: Global risk of invasion by the mosquito *Aedes albopictus*. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases* **7**, 76-85.
- Bennetzen JL (2000) Transposable element contributions to plant gene and genome evolution. *Plant Molecular Biology* **42**, 251-269.

- Berticat C, Bonnet J, Duchon S, *et al.* (2008) Costs and benefits of multiple resistance to insecticides for *Culex quinquefasciatus* mosquitoes. *BMC Evol Biol* **8**, 104.
- Bjorkman J, Andersson DI (2000) The cost of antibiotic resistance from a bacterial perspective. *Drug Resistance Updates* **3**, 237-245.
- Bjorkman J, Hughes D, Andersson DI (1998) Virulence of antibiotic-resistant *Salmonella typhimurium*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **95**, 3949-3953.
- Bonin A, Bellemain E, Eidesen PB, *et al.* (2004) How to track and assess genotyping errors in population genetics studies. *Molecular Ecology* **13**, 3261-3273.
- Bonin A, Taberlet P, Miaud C, Pompanon F (2006) Explorative genome scan to detect candidate loci for adaptation along a gradient of altitude in the common frog (*Rana temporaria*). *Molecular Biology And Evolution* **23**, 773-783.
- Bouma JE, Lenski RE (1988) Evolution Of A Bacteria Plasmid Association. *Nature* **335**, 351-352.
- Bourguet D (1999) The evolution of dominance. *Heredity* **83**, 1-4.
- Bourguet D, Guillemaud T, Chevillon C, Raymond M (2004) Fitness costs of insecticide resistance in natural breeding sites of the mosquito *Culex pipiens*. *Evolution* **58**, 128-135.
- Bourguet D, Lenormand T, Guillemaud T, *et al.* (1997) Variation of dominance of newly arisen adaptive genes. *Genetics* **147**, 1225-1234.
- Bourguet D, Prout M, Raymond M (1996) Dominance of insecticide resistance presents a plastic response. *Genetics* **143**, 407-416.
- Boyer S, Serandour J, Lemperiere G, Raveton M, Ravanel P (2006) Do herbicide treatments reduce the sensitivity of mosquito larvae to insecticides? *Chemosphere* **65**, 721-724.
- Boyer S, Tilquin M, Ravanel P (2007) Differential sensitivity to *Bacillus thuringiensis* var. *Israelensis* and temephos in field mosquito populations of *Ochlerotatus cataphylla* (Diptera: Culicidae): Toward resistance? *Environmental Toxicology And Chemistry* **26**, 157-162.
- Bravo A, Gill SS, Soberon M (2007) Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. *Toxicon* **49**, 423-435.
- Bravo A, Gomez I, Conde J, *et al.* (2004) Oligomerization triggers binding of a *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab pore-forming toxin to aminopeptidase N receptor leading to insertion into membrane microdomains. *Biochimica Et Biophysica Acta-Biomembranes* **1667**, 38-46.
- Broadhurst MD (1998) The influence of the molecular basis of resistance on insecticide discovery. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* **353**, 1723-1728.
- Brogdon WG, McAllister JC (1998) Insecticide resistance and vector control. *Emerging Infectious Diseases* **4**, 605-613.
- Brugmans B, van der Hulst RGM, Visser RGF, Lindhout P, van Eck HJ (2003) A new and versatile method for the successful conversion of AFLP (TM) markers into simple single locus markers. *Nucleic Acids Research* **31**.
- Bryan JH, Foley DH, Geary M, Carven CTJ (1991) *Anopheles-Annulipes* Walker (Diptera, Culicidae) At Griffith, New-South-Wales.3. Dispersal Of 2 Sibling Species. *Journal Of The Australian Entomological Society* **30**, 119-121.
- Bureau TE, Wessler SR (1992) Tourist - A Large Family Of Small Inverted Repeat Elements Frequently Associated With Maize Genes. *Plant Cell* **4**, 1283-1294.
- Butko P (2003) Cytolytic toxin Cyt1A and its mechanism of membrane damage: Data and hypotheses. *Applied And Environmental Microbiology* **69**, 2415-2422.

- Buzdin AA, Revina LP, Kostina LI, Zalunin IA, Chestukhina GG (2002) Interaction of 65- and 62-kD proteins from the apical membranes of the *Aedes aegypti* larvae midgut epithelium with Cry4B and Cry11A endotoxins of *Bacillus thuringiensis*. *Biochemistry-Moscow* **67**, 540-546.
- Campbell D, Bernatchez L (2004) Generic scan using AFLP markers as a means to assess the role of directional selection in the divergence of sympatric whitefish ecotypes. *Molecular Biology And Evolution* **21**, 945-956.
- Carriere Y, Tabashnik BE (2001) Reversing insect adaptation to transgenic insecticidal plants. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* **268**, 1475-1480.
- Charbonneau CS, Drobney RD, Rabeni CF (1994) Effects Of *Bacillus-Thuringiensis* Var *Israelensis* On Nontarget Benthic Organisms In A Lentic Habitat And Factors Affecting The Efficacy Of The Larvicide. *Environmental Toxicology And Chemistry* **13**, 267-279.
- Charlesworth B (1998) Adaptive evolution: The struggle for dominance. *Current Biology* **8**, R502-R504.
- Charlesworth B, Charlesworth D (1998) Some evolutionary consequences of deleterious mutations. *Genetica* **102-3**, 3-19.
- Chen B, Harbach RE, Butlin RK (2004) Genetic variation and population structure of the mosquito *Anopheles jeyporiensis* in southern China. *Molecular Ecology* **13**, 3051-3056.
- Chen JW, Aimanova KG, Pan SQ, Gill SS (2009) Identification and characterization of *Aedes aegypti* aminopeptidase N as a putative receptor of *Bacillus thuringiensis* Cry11A toxin. *Insect Biochemistry And Molecular Biology* **39**, 688-696.
- Chen S, Li XC (2007) Transposable elements are enriched within or in close proximity to xenobiotic-metabolizing cytochrome P450 genes. *Bmc Evolutionary Biology* **7**.
- Cohan FM, King EC, Zawadzki P (1994) Amelioration Of The Deleterious Pleiotropic Effects Of An Adaptive Mutation In *Bacillus-Subtilis*. *Evolution* **48**, 81-95.
- Costantini C, Li SG, DellaTorre A, *et al.* (1996) Density, survival and dispersal of *Anopheles gambiae* complex mosquitoes in a West African Sudan savanna village. *Medical And Veterinary Entomology* **10**, 203-219.
- Coustau C, Chevillon C, ffrench-Constant R (2000) Resistance to xenobiotics and parasites: can we count the cost? *Trends In Ecology & Evolution* **15**, 378-383.
- Crickmore N, Zeigler DR, Feitelson J, *et al.* (1998) Revision of the nomenclature for the *Bacillus thuringiensis* pesticidal crystal proteins. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* **62**, 807.
- Crickmore N, Zeigler DR, Schnepf E, *et al.* (2009) *Bacillus thuringiensis* toxin nomenclature, http://www.lifesci.sussex.ac.uk/Home/Neil_Crickmore/Bt/.
- Dalla Pozza G, Majori G (1992) First record of *Aedes albopictus* establishment in Italy. *Journal of the American Mosquito Control Association* **8**, 318-320.
- Darboux I, Charles JF, Pauchet Y, Warot S, Pauron D (2007) Transposon-mediated resistance to *Bacillus sphaericus* in a field-evolved population of *Culex pipiens* (Diptera: Culicidae). *Cellular Microbiology* **9**, 2022-2029.
- Darwin CR (1859) On the origin of species by means of natural selection, or the preservation of favoured races in the struggle for life. London, John Murray.
- David JP, Huber K, Failloux AB, Rey D, Meyran JC (2003) The role of environment in shaping the genetic diversity of the subalpine mosquito, *Aedes rusticus* (Diptera, Culicidae). *Molecular Ecology* **12**, 1951-1961.
- David JP, Rey D, Marigo G, Meyran JC (2000) Larvicidal effect of a cell-wall fraction isolated from alder decaying leaves. *Journal Of Chemical Ecology* **26**, 901-913.

- David JP, Strode C, Vontas J, *et al.* (2005) The *Anopheles gambiae* detoxification chip: A highly specific microarray to study metabolic-based insecticide resistance in malaria vectors. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **102**, 4080-4084.
- de Barjac H (1978) [A new variety of *Bacillus thuringiensis* very toxic to mosquitoes: *B. thuringiensis* var. *israelensis* serotype 14]. *C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D* **286**, 797-800.
- de Maagd RA, Bravo A, Crickmore N (2001) How *Bacillus thuringiensis* has evolved specific toxins to colonize the insect world. *Trends In Genetics* **17**, 193-199.
- de Meaux J, Mitchell-Olds T (2003) Evolution of plant resistance at the molecular level: ecological context of species interactions. *Heredity* **91**, 345-352.
- De Oliveira CMF, Costa F, Beltran JFN, Silva-Filha MH, Regis L (2003) Biological fitness of a *Culex quinquefasciatus* population and its resistance to *Bacillus sphaericus*. *Journal Of The American Mosquito Control Association* **19**, 125-129.
- De Respinis S, Demarta A, Patocchi N, *et al.* (2006) Molecular identification of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* to trace its fate after application as a biological insecticide in wetland ecosystems. *Letters In Applied Microbiology* **43**, 495-501.
- Delecluse A, Poncet S, Klier A, Rapoport G (1993) Expression Of *CryIa* And *CryIb* Genes, Independently Or In Combination, In A Crystal-Negative Strain Of *Bacillus-Thuringiensis* Subsp *Israelensis*. *Applied And Environmental Microbiology* **59**, 3922-3927.
- Denholm I, Rowland MW (1992) Tactics For Managing Pesticide Resistance In Arthropods - Theory And Practice. *Annual Review Of Entomology* **37**, 91-112.
- Egan SP, Nosil P, Funk DJ (2008) Selection and genomic differentiation during ecological speciation: Isolating the contributions of host association via a comparative genome scan of *Neochlamisus bebbianae* leaf beetles. *Evolution* **62**, 1162-1181.
- Eid J, Fehr A, Gray J, *et al.* (2009) Real-Time DNA Sequencing from Single Polymerase Molecules. *Science* **323**, 133-138.
- Enserink M (2007) Infectious diseases - Chikungunya: No longer a Third World disease. *Science* **318**, 1860-1861.
- Fabrick J, Oppert C, Lorenzen MD, *et al.* (2009) A Novel *Tenebrio molitor* Cadherin Is a Functional Receptor for *Bacillus thuringiensis* *Cry3Aa* Toxin. *Journal Of Biological Chemistry* **284**, 18401-18410.
- Fernandez LE, Aimanova KG, Gill SS, Bravo A, Soberon M (2006) A GPI-anchored alkaline phosphatase is a functional midgut receptor of *Cry11Aa* toxin in *Aedes aegypti* larvae. *Biochemical Journal* **394**, 77-84.
- Ferre J, Van Rie J (2002) Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review Of Entomology* **47**, 501-533.
- Ferreira L, Molina JC, Brasil C, Andrade G (2003) Evaluation of *Bacillus thuringiensis* bioinsecticidal protein effects on soil microorganisms. *Plant And Soil* **256**, 161-168.
- Feschotte C, Jiang N, Wessler SR (2002) Plant transposable elements: Where genetics meets genomics. *Nature Reviews Genetics* **3**, 329-341.
- Ffrench-Constant RH (2007) Which came first: insecticides or resistance? *Trends In Genetics* **23**, 1-4.
- Ffrench-Constant RH, Daborn PJ, Le Goff G (2004) The genetics and genomics of insecticide resistance. *Trends In Genetics* **20**, 163-170.
- Ffrench-Constant RH, Pittendrigh B, Vaughan A, Anthony N (1998) Why are there so few resistance-associated mutations in insecticide target genes? *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* **353**, 1685-1693.

- Ficetola GF, Miaud C, Pompanon F, Taberlet P (2008) Species detection using environmental DNA from water samples. *Biology Letters* **4**, 423-425.
- Fisher RA (1928) The possible modification of the response of the wild type to recurrent mutations. *American Naturalist* **62**, 115-126.
- Fitzpatrick MJ, Ben-Shahar Y, Smid HM, *et al.* (2005) Candidate genes for behavioural ecology. *Trends In Ecology & Evolution* **20**, 96-104.
- Flint J, Mott R (2001) Finding the molecular basis of quantitative traits: Successes and pitfalls. *Nature Reviews Genetics* **2**, 437-445.
- Foll M, Beaumont MA, Gaggiotti O (2008) An approximate Bayesian computation approach to overcome biases that arise when using amplified fragment length polymorphism markers to study population structure. *Genetics* **179**, 927-939.
- Foll M, Gaggiotti O (2008) A genome-scan method to identify selected loci appropriate for both dominant and codominant markers: a bayesian perspective. *Genetics* **180**, 977-993.
- Gahan LJ, Gould F, Heckel DG (2001) Identification of a gene associated with bit resistance in *Heliothis virescens*. *Science* **293**, 857-860.
- Gassmann AJ, Carriere Y, Tabashnik BE (2009) Fitness Costs of Insect Resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review Of Entomology* **54**, 147-163.
- Gebremedhin B, Ficetola GF, Naderi S, *et al.* (2009) Frontiers in identifying conservation units: from neutral markers to adaptive genetic variation. *Animal Conservation* **12**, 107-109.
- Georghiou GP, Wirth MC (1997) Influence of exposure to single versus multiple toxins of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* on development of resistance in the mosquito *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). *Applied And Environmental Microbiology* **63**, 1095-1101.
- Georghiou P, Taylor CE (1986) Factors influencing the evolution of resistance. In: *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*, 157-169. National Academy press, Washington, D. C.
- Gilliland LU, McKinney EC, Asmussen MA, Meagher RB (1998) Detection of deleterious genotypes in multigenerational studies. I. Disruptions in individual *Arabidopsis* actin genes. *Genetics* **149**, 717-725.
- Glaser JA, Matten SR (2003) Sustainability of insect resistance management strategies for transgenic Bt corn. *Biotechnology Advances* **22**, 45-69.
- Goldman IF, Arnold J, Carlton BC (1986) Selection For Resistance To *Bacillus-Thuringiensis* Subspecies *Israelensis* In Field And Laboratory Populations Of The Mosquito *Aedes-Aegypti*. *Journal Of Invertebrate Pathology* **47**, 317-324.
- Gomez I, Sanchez J, Miranda R, Bravo A, Soberon M (2002) Cadherin-like receptor binding facilitates proteolytic cleavage of helix alpha-1 in domain I and oligomer pre-pore formation of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Febs Letters* **513**, 242-246.
- Gonzalez JM, Brown BJ, Carlton BC (1982) Transfer Of *Bacillus-Thuringiensis* Plasmids Coding For Delta-Endotoxin Among Strains Of *B-Thuringiensis* And *B-Cereus*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America-Biological Sciences* **79**, 6951-6955.
- Gould EA, Higgs S (2009) Impact of climate change and other factors on emerging arbovirus diseases. *Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene* **103**, 109-121.
- Gould F (1995) Comparisons between resistance management strategies for insects and weeds. *Weed Technology* **9**, 830-839.
- Gould F, Anderson A, Jones A, *et al.* (1997) Initial frequency of alleles for resistance to *Bacillus*

- thuringiensis toxins in field populations of *Heliothis virescens*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **94**, 3519-3523.
- Gould F, Martinezramirez A, Anderson A, *et al.* (1992) Broad-Spectrum Resistance To *Bacillus-Thuringiensis* Toxins In *Heliothis-Virescens*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **89**, 7986-7990.
- Grahame JW, Wilding CS, Butlin RK (2006) Adaptation to a steep environmental gradient and an associated barrier to gene exchange in *Littorina saxatilis*. *Evolution* **60**, 268-278.
- Green M, Heumann M, Sokolow R, *et al.* (1990) Public-Health Implications Of The Microbial Pesticide *Bacillus-Thuringiensis* - An Epidemiologic-Study, Oregon, 1985-86. *American Journal Of Public Health* **80**, 848-852.
- Gressel J (1986) Modes and genetics of herbicides resistance in plants. In: *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*, 54-73. National Academy press, Washington, D. C.
- Griffitts JS, Aroian RV (2005) Many roads to resistance: how invertebrates adapt to Bt toxins. *Bioessays* **27**, 614-624.
- Griffitts JS, Haslam SM, Yang TL, *et al.* (2005) Glycolipids as receptors for *Bacillus thuringiensis* crystal toxin. *Science* **307**, 922-925.
- Griffitts JS, Whitacre JL, Stevens DE, Aroian RV (2001) Bt toxin resistance from loss of a putative carbohydrate-modifying enzyme. *Science* **293**, 860-864.
- Guillemaud T, Lenormand T, Bourguet D, *et al.* (1998) Evolution of resistance in *Culex pipiens*: Allele replacement and changing environment. *Evolution* **52**, 443-453.
- Gunning RV, Dang HT, Kemp FC, Nicholson IC, Moores GD (2005) New resistance mechanism in *Helicoverpa armigera* threatens transgenic crops expressing *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac toxin. *Applied And Environmental Microbiology* **71**, 2558-2563.
- Hagler JR, Jackson CG (2001) Methods for marking insects: Current techniques and future prospects. *Annual Review Of Entomology* **46**, 511-543.
- Haider MZ, Ellar DJ (1989) Functional Mapping Of An Entomocidal Delta-Endotoxin - Single Amino-Acid Changes Produced By Site-Directed Mutagenesis Influence Toxicity And Specificity Of The Protein. *Journal Of Molecular Biology* **208**, 183-194.
- Hajaij M, Carron A, Deleuze J, *et al.* (2005) Low persistence of *Bacillus thuringiensis* serovar israelensis spores in four mosquito biotopes of a salt marsh in southern france. *Microbial Ecology* **50**, 475-487.
- Hall RJ, Gubbins S, Gilligan CA (2004) Invasion of drug and pesticide resistance is determined by a trade-off between treatment efficacy and relative fitness. *Bulletin Of Mathematical Biology* **66**, 825-840.
- Hamblin MT, Casa AM, Sun H, *et al.* (2006) Challenges of detecting directional selection after a bottleneck: Lessons from *Sorghum bicolor*. *Genetics* **173**, 953-964.
- Hampe J, Franke A, Rosenstiel P, *et al.* (2007) A genome-wide association scan of nonsynonymous SNPs identifies a susceptibility variant for Crohn disease in ATG16L1. *Nature Genetics* **39**, 207-211.
- Hansen BM, Damgaard PH, Eilenberg J, Pedersen JC (1998) Molecular and phenotypic characterization of *Bacillus thuringiensis* isolated from leaves and insects. *Journal Of Invertebrate Pathology* **71**, 106-114.
- Hansen BM, Hendriksen NB (2001) Detection of enterotoxigenic *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* strains by PCR analysis. *Applied And Environmental Microbiology* **67**, 185-189.
- Hardstone MC, Lazzaro BP, Scott JG (2009) The effect of three environmental conditions on the fitness of cytochrome P450 monooxygenase-mediated permethrin resistance in *Culex pipiens*

- quinquefasciatus. *Bmc Evolutionary Biology* **9**.
- Harrington LC, Scott TW, Lerdthusnee K, *et al.* (2005) Dispersal of the dengue vector *Aedes aegypti* within and between rural communities. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* **72**, 209-220.
- Hartley CJ, Newcomb RD, Russell RJ, *et al.* (2006) Amplification of DNA from preserved specimens shows blowflies were preadapted for the rapid evolution of insecticide resistance. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **103**, 8757-8762.
- Heimpel AM, Angus TA (1960) Bacterial Insecticides. *Bacteriological Reviews* **24**, 266-288.
- Hemingway J, Hawkes NJ, McCarroll L, Ranson H (2004) The molecular basis of insecticide resistance in mosquitoes. *Insect Biochemistry And Molecular Biology* **34**, 653-665.
- Hemingway J, Ranson H (2000) Insecticide resistance in insect vectors of human disease. *Annual Review Of Entomology* **45**, 371-391.
- Herrero S, Gechev T, Bakker PL, Moar WJ, de Maagd RA (2005) *Bacillus thuringiensis* Cry1Ca-resistant *Spodoptera exigua* lacks expression of one of four Aminopeptidase N genes. *Bmc Genomics* **6**.
- Hershey AE, Shannon L, Axler R, Ernst C, Mickelson P (1995) Effects Of Methoprene And Bti (*Bacillus-Thuringiensis* Var *Israelensis*) On Nontarget Insects. *Hydrobiologia* **308**, 219-227.
- Higginson DM, Morin S, Nyboer ME, *et al.* (2005) Evolutionary trade-offs of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* crops: Fitness cost affecting paternity. *Evolution* **59**, 915-920.
- Hirschhorn JN, Daly MJ (2005) Genome-wide association studies for common diseases and complex traits. *Nature Reviews Genetics* **6**, 95-108.
- Holt JS, Lebaron HM (1990) Significance And Distribution Of Herbicide Resistance. *Weed Technology* **4**, 141-149.
- Holt RA, Subramanian GM, Halpern A, *et al.* (2002) The genome sequence of the malaria mosquito *Anopheles gambiae*. *Science* **298**, 129-+.
- Hua G, Zhang R, Abdullah MAF, Adang MJ (2008) *Anopheles gambiae* cadherin AgCad1 binds the Cry4Ba toxin of *Bacillus thuringiensis israelensis* and a fragment of AgCad1 synergizes toxicity. *Biochemistry* **47**, 5101-5110.
- Hua G, Zhang R, Bayyareddy K, Adang MJ (2009) *Anopheles gambiae* Alkaline Phosphatase Is a Functional Receptor of *Bacillus thuringiensis* jegathesan Cry11Ba Toxin. *Biochemistry* **48**, 9785-9793.
- Hubalek Z, Halouzka J (1999) West Nile fever - a reemerging mosquito-borne viral disease in Europe. *Emerging Infectious Diseases* **5**, 643-650.
- Hudson ME (2008) Sequencing breakthroughs for genomic ecology and evolutionary biology. *Molecular Ecology Resources* **8**, 3-17.
- Huffman DL, Bischof LJ, Griffiths JS, Aroian RV (2004) Pore worms: Using *Caenorhabditis elegans* to study how bacterial toxins interact with their target host. *International Journal Of Medical Microbiology* **293**, 599-607.
- Jaccoud D, Peng K, Feinstein D, Kilian A (2001) Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Res* **29**, E25.
- Janmaat AF, Myers JH (2005) The cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* varies with the host plant of *Trichoplusia ni*. *Proceedings Of The Royal Society B-Biological Sciences* **272**, 1031-1038.
- Jasieniuk M, BruleBabel AL, Morrison IN (1996) The evolution and genetics of herbicide resistance in weeds. *Weed Science* **44**, 176-193.

- Jensen GB, Hansen BM, Eilenberg J, Mahillon J (2003) The hidden lifestyles of *Bacillus cereus* and relatives. *Environmental Microbiology* **5**, 631-640.
- Jiang N, Wessler SR (2001) Insertion preference of maize and rice miniature inverted repeat transposable elements as revealed by the analysis of nested elements. *Plant Cell* **13**, 2553-2564.
- Johnson GCL, Esposito L, Barratt BJ, *et al.* (2001) Haplotype tagging for the identification of common disease genes. *Nature Genetics* **29**, 233-237.
- Joost S, Bonin A, Bruford MW, *et al.* (2007) A spatial analysis method (SAM) to detect candidate loci for selection: towards a landscape genomics approach to adaptation. *Molecular Ecology* **16**, 3955-3969.
- Jurat-Fuentes JL, Adang MJ (2004) Characterization of a Cry1Ac-receptor alkaline phosphatase in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *European Journal Of Biochemistry* **271**, 3127-3135.
- Jurat-Fuentes JL, Adang MJ (2006) Cry toxin mode of action in susceptible and resistant *Heliothis virescens* larvae. *Journal Of Invertebrate Pathology* **92**, 166-171.
- Jurat-Fuentes JL, Gould FL, Adang MJ (2003) Dual resistance to *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac and Cry2Aa toxins in *Heliothis virescens* suggests multiple mechanisms of resistance. *Applied And Environmental Microbiology* **69**, 5898-5906.
- Katbeh-Bader A, Khyami-Horani H, Mohsen ZH (1999) Effect of temperature on the susceptibility of *Culiseta longiareolata* (Macquart) (Dipt., Culicidae) to two standard strains of biocontrol bacteria. *Journal Of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie* **123**, 629-631.
- Kazazian HH (2004) Mobile elements: Drivers of genome evolution. *Science* **303**, 1626-1632.
- Kearsey MJ, Farquhar AGL (1998) QTL analysis in plants; where are we now? *Heredity* **80**, 137-142.
- Keller M, Sneh B, Strizhov N, *et al.* (1996) Digestion of delta-endotoxin by gut proteases may explain reduced sensitivity of advanced instar larvae of *Spodoptera littoralis* to CryIC. *Insect Biochemistry And Molecular Biology* **26**, 365-373.
- Kelley JL, Madeoy J, Calhoun JC, Swanson W, Akey JM (2006) Genomic signatures of positive selection in humans and the limits of outlier approaches. *Genome Research* **16**, 980-989.
- Killeen GF, Knols BGJ, Gu WD (2003) Taking malaria transmission out of the bottle: implications of mosquito dispersal for vector-control interventions. *Lancet Infectious Diseases* **3**, 297-303.
- Kishony R, Leibler S (2003) Environmental stresses can alleviate the average deleterious effect of mutations. *J Biol* **2**, 14.
- Krishnamoorthy M, Jurat-Fuentes JL, McNall RJ, Andacht T, Adang MJ (2007) Identification of novel Cry1Ac binding proteins in midgut membranes from *Heliothis virescens* using proteomic analyses. *Insect Biochemistry And Molecular Biology* **37**, 189-201.
- Kumar S, Chandra A, Pandey KC (2008) *Bacillus thuringiensis* (Bt) transgenic crop: An environment friendly insect-pest management strategy. *Journal Of Environmental Biology* **29**, 641-653.
- Labbe P, Berticat C, Berthomieu A, *et al.* (2007) Forty years of erratic insecticide resistance evolution in the Mosquito *Culex pipiens*. *Plos Genetics* **3**, 2190-2199.
- Labbe P, Sidos N, Raymond M, Lenormand T (2009) Resistance Gene Replacement in the Mosquito *Culex pipiens*: Fitness Estimation From Long-Term Cline Series. *Genetics* **182**, 303-312.
- Lacey LA (2007) *Bacillus thuringiensis* serovariety israelensis and *Bacillus sphaericus* for mosquito control. *Journal Of The American Mosquito Control Association* **23**, 133-163.
- Lacey LA, Siegel JP (2000) Safety and ecotoxicology of entomopathogenic bacteria. In: Charles J.-F.,

- Delécluse A. and Nielsen-LeRoux C., eds. "Entomopathogenic Bacteria: From laboratory to field application". 253-273.
- LeBaron H (1986) Tactics for prevention and management. In: *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*, 313-326. National Academy press, Washington, D. C.
- Lecadet MM, Blondel MO, Ribier J (1980) Generalized Transduction In *Bacillus-Thuringiensis* Var Berliner-1715 Using Bacteriophage-Cp-54ber. *Journal Of General Microbiology* **121**, 203-212.
- Lee YW, Zairi J (2005) Laboratory evaluation of *Bacillus thuringiensis* H-14 against *Aedes aegypti*. *Tropical Biomedicine* **22**, 5-10.
- Lehmann T, Besansky NJ, Hawley WA, *et al.* (1997) Microgeographic structure of *Anopheles gambiae* in western Kenya based on mtDNA and microsatellite loci. *Molecular Ecology* **6**, 243-253.
- Lenormand T (2002) Gene flow and the limits to natural selection. *Trends In Ecology & Evolution* **17**, 183-189.
- Lenormand T, Bourguet D, Guillemaud T, Raymond M (1999) Tracking the evolution of insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*. *Nature* **400**, 861-864.
- Lenormand T, Raymond M (1998) Resistance management: the stable zone strategy. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* **265**, 1985-1990.
- Lenormand T, Raymond M (2000) Analysis of clines with variable selection and variable migration. *American Naturalist* **155**, 70-82.
- Lenski RE (1988) Experimental Studies Of Pleiotropy And Epistasis In *Escherichia-Coli*.2. Compensation For Maladaptive Effects Associated With Resistance To Virus-T4. *Evolution* **42**, 433-440.
- Levin BR, Perrot V, Walker N (2000) Compensatory mutations, antibiotic resistance and the population genetics of adaptive evolution in bacteria. *Genetics* **154**, 985-997.
- Li HR, Oppert B, Higgins RA, *et al.* (2004) Comparative analysis of proteinase activities of *Bacillus thuringiensis*-resistant and -susceptible *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Insect Biochemistry And Molecular Biology* **34**, 753-762.
- Lindquist AW, Wilson HG (1948) Development Of A Strain Of Houseflies Resistant To Ddt. *Science* **107**, 276-276.
- Liu F, Miyata T, Wu ZJ, *et al.* (2008) Effects of temperature on fitness costs, insecticide susceptibility and heat shock protein in insecticide-resistant and -susceptible *Plutella xylostella*. *Pesticide Biochemistry And Physiology* **91**, 45-52.
- Liu YB, Tabashnik BE (1997) Experimental evidence that refuges delay insect adaptation to *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* **264**, 605-610.
- Luikart G, England PR, Tallmon D, Jordan S, Taberlet P (2003) The power and promise of population genomics: From genotyping to genome typing. *Nature Reviews Genetics* **4**, 981-994.
- Lyons M, Cardle L, Rostoks N, Waugh R, Flavell AJ (2008) Isolation, analysis and marker utility of novel miniature inverted repeat transposable elements from the barley genome. *Molecular Genetics And Genomics* **280**, 275-285.
- Maciel-De-Freitas R, Codeco CT, Lourenco-De-Oliveira R (2007) Daily survival rates and dispersal of *Aedes aegypti* females in Rio de Janeiro, Brazil. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* **76**, 659-665.
- Mackay TFC (2001a) The genetic architecture of quantitative traits. *Annual Review Of Genetics* **35**, 303-339.

- Mackay TFC (2001b) Quantitative trait loci in *Drosophila*. *Nature Reviews Genetics* **2**, 11-20.
- Maduell P, Armengol G, Llagostera M, Orduz S, Lindow S (2008) *B. Thuringiensis* is a poor colonist of leaf surfaces. *Microbial Ecology* **55**, 212-219.
- Makinen HS, Shikano T, Cano JM, Merila J (2008) Hitchhiking mapping reveals a candidate genomic region for natural selection in three-spined stickleback chromosome VIII. *Genetics* **178**, 453-465.
- Manceva SD, Pusztai-Carey M, Butko P (2004) Effect of pH and ionic strength on the cytolytic toxin Cyt1A: a fluorescence spectroscopy study. *Biochimica Et Biophysica Acta-Proteins And Proteomics* **1699**, 123-130.
- Manceva SD, Pusztai-Carey M, Russo PS, Butko P (2005) A detergent-like mechanism of action of the cytolytic toxin Cyt1A from *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Biochemistry* **44**, 589-597.
- Margulies M, Egholm M, Altman WE, *et al.* (2005) Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* **437**, 376-380.
- Martin PAW, Travers RS (1989) Worldwide Abundance And Distribution Of *Bacillus-Thuringiensis* Isolates. *Applied And Environmental Microbiology* **55**, 2437-2442.
- Martinez-Torres D, Chandre F, Williamson MS, *et al.* (1998) Molecular characterization of pyrethroid knockdown resistance (kdr) in the major malaria vector *Anopheles gambiae* S.S. *Insect Molecular Biology* **7**, 179-184.
- Matsuzaki H, Loi H, Dong S, *et al.* (2004) Parallel genotyping of over 10,000 SNPs using a one-primer assay on a high-density oligonucleotide array. *Genome Research* **14**, 414-425.
- May RM, Dobson AP (1986) Population dynamics and the rate of evolution of pesticide resistance. In: *Pesticide Resistance: Strategies and Tactics for Management*, 170-191. National Academy press, Washington, D. C.
- McClintock JT, Schaffer CR, Sjoblad RD (1995) A Comparative Review Of The Mammalian Toxicity Of *Bacillus Thuringiensis*-Based Pesticides. *Pesticide Science* **45**, 95-105.
- McNall RJ, Adang MJ (2003) Identification of novel *Bacillus thuringiensis* Cry1Ac binding proteins in *Manduca sexta* midgut through proteomic analysis. *Insect Biochemistry And Molecular Biology* **33**, 999-1010.
- Merrill SA, Ramberg FB, Hagedorn HH (2005) Phylogeography and population structure of *Aedes aegypti* in Arizona. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **72**, 304-310.
- Meunier L, Prefontaine G, Van Munster M, Brousseau R, Masson L (2006) Transcriptional response of *Choristoneura fumiferana* to sublethal exposure of Cry1Ab protoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Insect Molecular Biology* **15**, 475-483.
- Meyer CL, Vitalis R, Saumitou-Laprade P, Castric V (2009) Genomic pattern of adaptive divergence in *Arabidopsis halleri*, a model species for tolerance to heavy metal. *Molecular Ecology* **18**, 2050-2062.
- Michel AP, Ingrassi MJ, Schemerhorn BJ, *et al.* (2005) Rangewide population genetic structure of the African malaria vector *Anopheles funestus*. *Molecular Ecology* **14**, 4235-4248.
- Midega JT, Mbogo CM, Mwambi H, *et al.* (2007) Estimating dispersal and survival of *Anopheles gambiae* and *Anopheles funestus* along the Kenyan coast by using mark-release-recapture methods. *Journal Of Medical Entomology* **44**, 923-929.
- Mittal PK, Adak T, Subbarao SK (2005) Laboratory selection to investigate the development of resistance to *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* H-14 in *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). *National Academy Science Letters-India* **28**, 281-283.

- Morin S, Biggs RW, Sisterson MS, *et al.* (2003) Three cadherin alleles associated with resistance to *Bacillus thuringiensis* in pink bollworm. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **100**, 5004-5009.
- Muchaonyerwa P, Waladde S, Nyamugafata P, Mpeperekwi S, Ristori GG (2004) Persistence and impact on microorganisms of *Bacillus thuringiensis* proteins in some Zimbabwean soils. *Plant And Soil* **266**, 41-46.
- Muir LE, Kay BH (1998) *Aedes aegypti* survival and dispersal estimated by mark-release-recapture in northern Australia. *American Journal Of Tropical Medicine And Hygiene* **58**, 277-282.
- Nair S, Williams JT, Brockman A, *et al.* (2003) A selective sweep driven by pyrimethamine treatment in southeast Asian malaria parasites. *Molecular Biology And Evolution* **20**, 1526-1536.
- Nauen R (2007) Insecticide resistance in disease vectors of public health importance. *Pest Management Science* **63**, 628-633.
- Nayar JK, Knight JW, Ali A, Carlson DB, O'Bryan PD (1999) Laboratory evaluation of biotic and abiotic factors that may influence larvicidal activity of *Bacillus thuringiensis* serovar. israelensis against two Florida mosquito species. *Journal Of The American Mosquito Control Association* **15**, 32-42.
- Nene V, Wortman JR, Lawson D, *et al.* (2007) Genome sequence of *Aedes aegypti*, a major arbovirus vector. *Science* **316**, 1718-1723.
- Niebylski ML, Craig GB (1994) Dispersal And Survival Of *Aedes-Albopictus* At A Scrap Tire Yard In Missouri. *Journal Of The American Mosquito Control Association* **10**, 339-343.
- Normark BH, Normark S (2002) Evolution and spread of antibiotic resistance. *Journal Of Internal Medicine* **252**, 91-106.
- Nosil P, Egan SP, Funk DJ (2008) Heterogeneous genomic differentiation between walking-stick ecotypes: "Isolation by adaptation" and multiple roles for divergent selection. *Evolution* **62**, 316-336.
- Nosil P, Funk DJ, Ortiz-Barrientos D (2009) Divergent selection and heterogeneous genomic divergence. *Molecular Ecology* **18**, 375-402.
- O'Loughlin SM, Somboon P, Walton C (2007) High levels of population structure caused by habitat islands in the malarial vector *Anopheles scanloni*. *Heredity* **99**, 31-40.
- Oakeshott JG, Horne I, Sutherland TD, Russell RJ (2003) The genomics of insecticide resistance. *Genome Biology* **4**.
- Oliver KR, Greene WK (2009) Transposable elements: powerful facilitators of evolution. *Bioessays* **31**, 703-714.
- Oppert B, Kramer KJ, Beeman RW, Johnson D, McGaughey WH (1997) Proteinase-mediated insect resistance to *Bacillus thuringiensis* toxins. *Journal Of Biological Chemistry* **272**, 23473-23476.
- Orr HA (2005) The genetic theory of adaptation: A brief history. *Nature Reviews Genetics* **6**, 119-127.
- Otieno-Ayayo ZN, Zaritsky A, Wirth MC, *et al.* (2008) Variations in the mosquito larvicidal activities of toxins from *Bacillus thuringiensis* ssp israelensis. *Environmental Microbiology* **10**, 2191-2199.
- Pang ASD, Gringorten JL (1998) Degradation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin in host insect gut juice. *Fems Microbiology Letters* **167**, 281-285.
- Pardo-Lopez L, Munoz-Garay C, Porta H, *et al.* (2009) Strategies to improve the insecticidal activity of Cry toxins from *Bacillus thuringiensis*. *Peptides* **30**, 589-595.
- Paris M, Roux F, Berard A, Reboud X (2008) The effects of the genetic background on herbicide

- resistance fitness cost and its associated dominance in *Arabidopsis thaliana*. *Heredity* **101**, 499-506.
- Pates H, Curtis C (2005) Mosquito behavior and vector control. *Annual Review Of Entomology* **50**, 53-70.
- Patz JA, Epstein PR, Burke TA, Balbus JM (1996) Global climate change and emerging infectious diseases. *Jama-Journal Of The American Medical Association* **275**, 217-223.
- Paul A, Harrington LC, Zhang L, Scott JG (2005) Insecticide resistance in *Culex pipiens* from New York. *Journal of The American Mosquito Control Association* **21**, 305-309.
- Paupy C, Orsoni A, Mousson L, Huber K (2004) Comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP), microsatellite, and isoenzyme markers: Population genetics of *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) from Phnom Penh (Cambodia). *Journal of Medical Entomology* **41**, 664-671.
- Perez C, Fernandez LE, Sun JG, *et al.* (2005) *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* Cyt1Aa synergizes Cry11Aa toxin by functioning as a membrane-bound receptor. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **102**, 18303-18308.
- Perez C, Munoz-Garay C, Portugal LC, *et al.* (2007) *Bacillus thuringiensis* ssp *israelensis* Cyt1Aa enhances activity of Cry11Aa toxin by facilitating the formation of a pre-pore oligomeric structure. *Cellular Microbiology* **9**, 2931-2937.
- Pigott CR, Ellar DJ (2007) Role of receptors in *Bacillus thuringiensis* crystal toxin activity. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* **71**, 255-+.
- Poncet S, Anello G, Delecluse A, Klier A, Rapoport G (1993) Role Of The CryIvD Polypeptide In The Overall Toxicity Of *Bacillus-Thuringiensis* Subsp *Israelensis*. *Applied And Environmental Microbiology* **59**, 3928-3930.
- Porretta D, Canestrelli D, Bellini R, Celli G, Urbanelli S (2007) Improving insect pest management through population genetic data: a case study of the mosquito *Ochlerotatus caspius* (Pallas). *Journal of Applied Ecology* **44**, 682-691.
- Poupardin R, Reynaud S, Strode C, *et al.* (2008) Cross-induction of detoxification genes by environmental xenobiotics and insecticides in the mosquito *Aedes aegypti*: Impact on larval tolerance to chemical insecticides. *Insect Biochemistry And Molecular Biology* **38**, 540-551.
- Powles SB, Preston C, Bryan IB, Jutsum AR (1997) Herbicide resistance: Impact and management. *Advances In Agronomy, Vol 58* **58**, 57-93.
- Preston C (2004) Herbicide resistance in weeds endowed by enhanced detoxification: complications for management. *Weed Science* **52**, 448-453.
- Preston C, Powles SB (2002) Evolution of herbicide resistance in weeds: initial frequency of target site-based resistance to acetolactate synthase-inhibiting herbicides in *Lolium rigidum*. *Heredity* **88**, 8-13.
- Promdonkoy B, Ellar DJ (2003) Investigation of the pore-forming mechanism of a cytolytic delta-endotoxin from *Bacillus thuringiensis*. *Biochemical Journal* **374**, 255-259.
- Purrington CB (2000) Costs of resistance. *Current Opinion In Plant Biology* **3**, 305-308.
- Purrington CB, Bergelson J (1997) Fitness consequences of genetically engineered herbicide and antibiotic resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **145**, 807-814.
- Rahman MM, Roberts HLS, Sarjan M, Asgari S, Schmidt O (2004) Induction and transmission of *Bacillus thuringiensis* tolerance in the flour moth *Ephestia kuehniella*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **101**, 2696-2699.
- Rajagopal R, Arora N, Sivakumar S, *et al.* (2009) Resistance of *Helicoverpa armigera* to Cry1Ac toxin from *Bacillus thuringiensis* is due to improper processing of the protoxin. *Biochemical*

Journal **419**, 309-316.

- Ranson H, Hemingway J (2005) Mosquito glutathione transferases. *Gluthione Transferases And Gamma-Glutamyl Transpeptidases* **401**, 226-+.
- Raymond M, Berticat C, Weill M, Pasteur N, Chevillon C (2001) Insecticide resistance in the mosquito *Culex pipiens*: what have we learned about adaptation? *Genetica* **112**, 287-296.
- Raymond M, Chevillon C, Guillemaud T, Lenormand T, Pasteur N (1998) An overview of the evolution of overproduced esterases in the mosquito *Culex pipiens*. *Philosophical Transactions Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* **353**, 1707-1711.
- Regis L, Silva-Filha MH, Nielsen-LeRoux C, Charles JF (2001) Bacteriological larvicides of dipteran disease vectors. *Trends In Parasitology* **17**, 377-380.
- Reiff DM, Kaneko A, Taleo G, Amos M, Lum JK (2007) Population structure and gene flow of *Anopheles farauti* s.s. (Diptera: Culicidae) among ten sites on five islands of Vanuatu: Implications for malaria control. *Journal Of Medical Entomology* **44**, 601-607.
- Reimand J, Kull M, Peterson H, Hansen J, Vilo J (2007) g: Profiler - a web-based toolset for functional profiling of gene lists from large-scale experiments. *Nucleic Acids Research* **35**, W193-W200.
- Reiter P (2007) Oviposition, dispersal, and survival in *Aedes aegypti*: Implications for the efficacy of control strategies. *Vector-Borne And Zoonotic Diseases* **7**, 261-273.
- Reiter P, Amador MA, Anderson RA, Clark GG (1995) Dispersal Of *Aedes-Aegypti* In An Urban Area After Blood-Feeding As Demonstrated By Rubidium-Marked Eggs. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* **52**, 177-179.
- Reynolds MG (2000) Compensatory evolution in rifampin-resistant *Escherichia coli*. *Genetics* **156**, 1471-1481.
- Rezza G, Nicoletti L, Angelini R, *et al.* (2007) Infection with chikungunya virus in Italy: an outbreak in a temperate region. *Lancet* **370**, 1840-1846.
- Riaz MA, Poupardin R, Reynaud S, *et al.* (2009) Impact of glyphosate and benzo[a]pyrene on the tolerance of mosquito larvae to chemical insecticides. Role of detoxification genes in response to xenobiotics. *Aquatic Toxicology* **93**, 61-69.
- Roux F, Camilleri C, Berard A, Reboud X (2005a) Multigenerational versus single generation studies to estimate herbicide resistance fitness cost in *Arabidopsis thaliana*. *Evolution* **59**, 2264-2269.
- Roux F, Camilleri C, Giancola S, Brunel D, Reboud X (2005b) Epistatic interactions among herbicide resistances in *Arabidopsis thaliana*: The fitness cost of multiresistance. *Genetics* **171**, 1277-1288.
- Roux F, Giancolat S, Durand S, Reboud X (2006) Building of an experimental cline with *Arabidopsis thaliana* to estimate herbicide fitness cost. *Genetics* **173**, 1023-1031.
- Roux F, Matejcek A, Gasquez J, Reboud X (2005c) Dominance variation across six herbicides of the *Arabidopsis thaliana* *csr1-1* and *csr1-2* resistance alleles. *Pest Management Science* **61**, 1089-1095.
- Roux F, Paris M, Reboud X (2008) Delaying weed adaptation to herbicide by environmental heterogeneity: a simulation approach. *Pest Management Science* **64**, 16-29.
- Rukmini V, Reddy CY, Venkateswerlu G (2000) *Bacillus thuringiensis* crystal delta-endotoxin: Role of proteases in the conversion of protoxin to toxin. *Biochimie* **82**, 109-116.
- Ryan GF (1970) Resistance Of Common Groundsel To Simazine And Atrazine. *Weed Science* **18**, 614-&.
- Saavedra-Rodriguez K, Strode C, Suarez AF, *et al.* (2008) Quantitative Trait Loci Mapping of

- Genome Regions Controlling Permethrin Resistance in the Mosquito *Aedes aegypti*. *Genetics* **180**, 1137-1152.
- Saleh MS, El-Meniawi FA, Kelada NL, Zahran HM (2003) Resistance development in mosquito larvae *Culex pipiens* to the bacterial agent *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis*. *Journal of Applied Entomology-Zeitschrift Fur Angewandte Entomologie* **127**, 29-32.
- Schafer M, Storch V, Kaiser A, Beck M, Becker N (1997) Dispersal behavior of adult snow melt mosquitoes in the upper Rhine valley, Germany. *Journal Of Vector Ecology* **22**, 1-5.
- Schlenke TA, Begun DJ (2004) Strong selective sweep associated with a transposon insertion in *Drosophila simulans*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **101**, 1626-1631.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, *et al.* (1998) *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* **62**, 775-+.
- Schrag SJ, Perrot V, Levin BR (1997) Adaptation to the fitness costs of antibiotic resistance in *Escherichia coli*. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* **264**, 1287-1291.
- Scott JG (1999) Cytochromes P450 and insecticide resistance. *Insect Biochemistry And Molecular Biology* **29**, 757-777.
- Serandour J, Girel J, Boyer S, *et al.* (2007) How human practices have affected vector-borne diseases in the past: a study of malaria transmission in Alpine valleys. *Malaria Journal* **6**.
- Severson DW, Knudson DL, Soares MB, Loftus BJ (2004) *Aedes aegypti* genomics. *Insect Biochemistry And Molecular Biology* **34**, 715-721.
- Shao ZZ, Cui YL, Liu XL, *et al.* (1998) Processing of delta-endotoxin of *Bacillus thuringiensis* subsp. *kurstaki* HD-1 in *Heliothis armigera* midgut juice and the effects of protease inhibitors. *Journal Of Invertebrate Pathology* **72**, 73-81.
- Smith JR, Freije D, Carpten JD, *et al.* (1996) Major susceptibility locus for prostate cancer on chromosome 1 suggested by a genome-wide search. *Science* **274**, 1371-1374.
- Soberon M, Gill SS, Bravo A (2009) Signaling versus punching hole: How do *Bacillus thuringiensis* toxins kill insect midgut cells? *Cellular And Molecular Life Sciences* **66**, 1337-1349.
- Sogin ML, Morrison HG, Huber JA, *et al.* (2006) Microbial diversity in the deep sea and the underexplored "rare biosphere". *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **103**, 12115-12120.
- Stevens MM, Akhurst RJ, Clifton MA, Hughes PA (2004) Factors affecting the toxicity of *Bacillus thuringiensis* var. *israelensis* and *Bacillus sphaericus* to fourth instar larvae of *Chironomus tepperi* (Diptera: Chironomidae). *Journal Of Invertebrate Pathology* **86**, 104-110.
- Stinchcombe JR, Hoekstra HE (2008) Combining population genomics and quantitative genetics: finding the genes underlying ecologically important traits. *Heredity* **100**, 158-170.
- Stotzky G (2004) Persistence and biological activity in soil of the insecticidal proteins from *Bacillus thuringiensis*, especially from transgenic plants. *Plant And Soil* **266**, 77-89.
- Strode C, Wondji CS, David JP, *et al.* (2008) Genomic analysis of detoxification genes in the mosquito *Aedes aegypti*. *Insect Biochemistry And Molecular Biology* **38**, 113-123.
- Sun M, Luo XX, Dai JY, *et al.* (1996) Evaluation of *Bacillus thuringiensis* and *Bacillus sphaericus* strains from Chinese soils toxic to mosquito larvae. *Journal Of Invertebrate Pathology* **68**, 74-77.
- Tabashnik BE, Liu YB, Finson N, Masson L, Heckel DG (1997) One gene in diamondback moth confers resistance to four *Bacillus thuringiensis* toxins. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **94**, 1640-1644.

- Taylor M, Feyereisen R (1996) Molecular biology and evolution of resistance to toxicants. *Molecular Biology And Evolution* **13**, 719-734.
- Teshima KM, Coop G, Przeworski M (2006) How reliable are empirical genomic scans for selective sweeps? *Genome Research* **16**, 702-712.
- Thomas DJI, Morgan JAW, Whipps JM, Saunders JR (2001) Plasmid transfer between *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* strains in laboratory culture, river water, and dipteran larvae. *Applied And Environmental Microbiology* **67**, 330-338.
- Thomas WE, Ellar DJ (1983) *Bacillus-Thuringiensis-Var-Israelensis* Crystal Delta-Endotoxin - Effects On Insect And Mammalian-Cells Invitro And Invivo. *Journal Of Cell Science* **60**, 181-197.
- Tilquin M, Paris M, Reynaud S, *et al.* (2008) Long lasting persistence of *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (Bti) in mosquito natural habitats. *PLoS ONE* **3**, e3432.
- Tranel PJ, Wright TR (2002) Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: what have we learned? *Weed Science* **50**, 700-712.
- Tsumura Y, Kado T, Takahashi T, *et al.* (2007) Genome scan to detect genetic structure and adaptive genes of natural populations of *Cryptomeria japonica*. *Genetics* **176**, 2393-2403.
- Urbanelli S, Bellini R, Carrieri M, Sallicandro P, Celli G (2000) Population structure of *Aedes albopictus* (Skuse): the mosquito which is colonizing Mediterranean countries. *Heredity* **84**, 331-337.
- Uyenoyama MK (1986) Inbreeding And The Cost Of Meiosis - The Evolution Of Selfing In Populations Practicing Biparental Inbreeding. *Evolution* **40**, 388-404.
- Vacher C, Bourguet D, Rousset F, Chevillon C, Hochberg ME (2003) Modelling the spatial configuration of refuges for a sustainable control of pests: a case study of Bt cotton. *Journal Of Evolutionary Biology* **16**, 378-387.
- Valentini A, Miquel C, Nawaz MA, *et al.* (2009) New perspectives in diet analysis based on DNA barcoding and parallel pyrosequencing: the trnL approach. *Molecular Ecology Resources* **9**, 51-60.
- van Munster M, Prefontaine G, Meunier L, *et al.* (2007) Altered gene expression in *Choristoneura fumiferana* and *Manduca sexta* in response to sublethal intoxication by *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin. *Insect Molecular Biology* **16**, 25-35.
- Vasemagi A, Nilsson J, Primmer CR (2005) Expressed sequence tag-linked microsatellites as a source of gene-associated polymorphisms for detecting signatures of divergent selection in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Molecular Biology And Evolution* **22**, 1067-1076.
- Vekemans X (2002) AFLP-SURV version 1.0. Distributed by the author. Laboratoire de Genetique et Ecologie Vegetale, Université Libre de Bruxelles, Belgium.
- Vettori C, Paffetti D, Saxena D, Stotzky G, Giannini R (2003) Persistence of toxins and cells of *Bacillus thuringiensis* subsp *kurstaki* introduced in sprays to Sardinia soils. *Soil Biology & Biochemistry* **35**, 1635-1642.
- Vila-Aiub MM, Neve P, Powles SB (2009) Fitness costs associated with evolved herbicide resistance alleles in plants. *New Phytologist* **184**, 751-767.
- Vitalis R, Dawson K, Boursot P, Belkhir K (2003) DetSel 1.0: A computer program to detect markers responding to selection. *Journal Of Heredity* **94**, 429-431.
- Voight BF, Kudaravalli S, Wen XQ, Pritchard JK (2006) A map of recent positive selection in the human genome. *Plos Biology* **4**, 446-458.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, *et al.* (1995) Aflp - A New Technique For DNA-Fingerprinting. *Nucleic Acids Research* **23**, 4407-4414.

- Watson TM, Saul A, Kay BH (2000) *Aedes notoscriptus* (Diptera: Culicidae) survival and dispersal estimated by mark-release-recapture in Brisbane, Queensland, Australia. *Journal Of Medical Entomology* **37**, 380-384.
- Weill M, Fort P, Berthomieu A, *et al.* (2002) A novel acetylcholinesterase gene in mosquitoes codes for the insecticide target and is non-homologous to the ace gene in *Drosophila*. *Proceedings Of The Royal Society Of London Series B-Biological Sciences* **269**, 2007-2016.
- Weill M, Lutfalla G, Mogensen K, *et al.* (2003) Insecticide resistance in mosquito vectors. *Nature* **423**, 136-137.
- Weir BS, Cockerham CC (1984) Estimating F-statistics for the analysis of population-structure. *Evolution* **38**, 1358-1370.
- Wenes AL, Bourguet D, Andow DA, *et al.* (2006) Frequency and fitness cost of resistance to *Bacillus thuringiensis* in *Chrysomela tremulae* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Heredity* **97**, 127-134.
- Wenzl P, Carling J, Kudrna D, *et al.* (2004) Diversity Arrays Technology (DArT) for whole-genome profiling of barley. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **101**, 9915-9920.
- Werck-Reichhart D, Hehn A, Didierjean L (2000) Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance. *Trends In Plant Science* **5**, 116-123.
- Wessler SR, Bureau TE, White SE (1995) Ltr-Retrotransposons And Mites - Important Players In The Evolution Of Plant Genomes. *Current Opinion In Genetics & Development* **5**, 814-821.
- WHO (1982) Data sheet on the biological control agent *Bacillus thuringiensis* serotype H-14 (de Barjac 1978). Geneva, World Health Organization (WHO/VBC/79.750 Rev. 1).
- WHO (2005) Guidelines for laboratory and field testing of mosquito larvicides. *Document WHO/CDS/WHOPES/GCDPP/13*, Geneva, Switzerland, World Health Organization 2005.
- Wilding CS, Butlin RK, Grahame J (2001) Differential gene exchange between parapatric morphs of *Littorina saxatilis* detected using AFLP markers. *Journal Of Evolutionary Biology* **14**, 611-619.
- Wirth MC, Ferrari JA, Georgiou GP (2001) Baseline susceptibility to bacterial insecticides in populations of *Culex pipiens* complex (Diptera: Culicidae) from California and from the Mediterranean island of Cyprus. *Journal Of Economic Entomology* **94**, 920-928.
- Wirth MC, Georgiou GP, Federici BA (1997) CytA enables CryIV endotoxins of *Bacillus thuringiensis* to overcome high levels of CryIV resistance in the mosquito, *Culex quinquefasciatus*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **94**, 10536-10540.
- Wondji C, Simard F, Lehmann T, *et al.* (2005) Impact of insecticide-treated bed nets implementation on the genetic structure of *Anopheles arabiensis* in an area of irrigated rice fields in the Sahelian region of Cameroon. *Molecular Ecology* **14**, 3683-3693.
- Wood HM, Grahame JW, Humphray S, Rogers J, Butlin RK (2008) Sequence differentiation in regions identified by a genome scan for local adaptation. *Molecular Ecology* **17**, 3123-3135.
- Wright SI, Gaut BS (2005) Molecular population genetics and the search for adaptive evolution in plants. *Molecular Biology And Evolution* **22**, 506-519.
- Wu D, Federici BA (1993) A 20-Kilodalton Protein Preserves Cell Viability And Promotes CytA Crystal-Formation During Sporulation In *Bacillus-Thuringiensis*. *Journal Of Bacteriology* **175**, 5276-5280.
- Wu D, Johnson JJ, Federici BA (1994) Synergism Of Mosquitocidal Toxicity Between CytA And CryIvD Proteins Using Inclusions Produced From Cloned Genes Of *Bacillus-Thuringiensis*. *Molecular Microbiology* **13**, 965-972.

- Yan G, Romero-Severson J, Walton M, Chadee DD, Severson DW (1999) Population genetics of the yellow fever mosquito in Trinidad: comparisons of amplified fragment length polymorphism (AFLP) and restriction fragment length polymorphism (RFLP) markers. *Molecular Ecology* **8**, 951-963.
- Yang YJ, Chen HY, Wu YD, Yang YH, Wu SW (2007) Mutated cadherin Alleles from a field population of *Helicoverpa armigera* confer resistance to *Bacillus thuringiensis* toxin Cry1Ac. *Applied And Environmental Microbiology* **73**, 6939-6944.
- Yu Q, Cairns A, Powles SB (2004) Paraquat resistance in a population of *Lolium rigidum*. *Functional Plant Biology* **31**, 247-254.
- Zhang HY, Yang CJ, Huang JY, Lu L (2004) Susceptibility of field populations of *Anopheles sinensis* (Diptera: Culicidae) to *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*. *Biocontrol Science And Technology* **14**, 321-325.
- Zhang R, Hua G, Andacht TM, Adang MJ (2008) A 106-kDa Aminopeptidase Is a Putative Receptor for *Bacillus thuringiensis* Cry11Ba Toxin in the Mosquito *Anopheles gambiae*. *Biochemistry* **47**, 11263-11272.
- Zhang X, Candas M, Griko NB, Rose-Young L, Bulla LA (2005) Cytotoxicity of *Bacillus thuringiensis* Cry1Ab toxin depends on specific binding of the toxin to the cadherin receptor BT-R-1 expressed in insect cells. *Cell Death And Differentiation* **12**, 1407-1416.
- Zhang XB, Candas M, Griko NB, Taussig R, Bulla LA (2006) A mechanism of cell death involving an adenylyl cyclase/PKA signaling pathway is induced by the Cry1Ab toxin of *Bacillus thuringiensis*. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences Of The United States Of America* **103**, 9897-9902.
- Zhang XL, Hong GF (2000) Preferential location of MITEs in rice genome. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica* **32**, 223-228.
- Zhao XC, Wu KM, Hang GM, Guo YY (2009) Modified female calling behaviour in Cry1Ac-resistant *Helicoverpa armigera* (Lepidoptera: Noctuidae). *Pest Management Science* **65**, 353-357.

Résumé :

La résistance aux insecticides chez les moustiques pose des problèmes de santé publique car ils sont vecteurs de nombreuses maladies comme la malaria, la dengue ou chikungunya. Une alternative aux insecticides chimiques est l'utilisation du bactério-insecticide *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis* (*Bti*) qui a l'avantage de produire un mélange de six toxines spécifiques des Diptères ayant des modes d'action différents. Il a été démontré que le *Bti* commercial pouvait proliférer et s'accumuler, entraînant une forte toxicité dans les litières végétales de certains gîtes à moustiques.

Afin d'étudier l'évolution de la résistance au *Bti* chez les moustiques, j'ai sélectionné en laboratoire une souche d'*Aedes aegypti* avec des litières végétales contenant des toxines de *Bti*. Une résistance multigénique aux toxines Cry du *Bti* est apparue en seulement quelques générations chez la souche sélectionnée. Plusieurs approches ont été utilisées pour rechercher les bases génétiques de la résistance au *Bti* chez la souche d'*Ae. aegypti* résistante. Deux « scans génomiques », l'un lié à des éléments transposables, l'autre à des marqueurs neutres AFLP, ont permis de déterminer plusieurs régions du génome présentant des signatures de sélection. Les niveaux de transcription de plus de 6000 gènes ont été comparés entre la souche résistante et une souche sensible d'*Ae. aegypti* grâce à un « scan transcriptomique » par séquençage haut débit. La combinaison de ces résultats avec une approche « gènes candidats » a permis d'obtenir et de travailler sur une liste de gènes potentiellement liés à la résistance au *Bti*. Parmi les gènes identifiés, un gène codant pour un récepteur membranaire potentiel des toxines du *Bti* (une cadhérine) présente des signatures de sélection chez la souche résistante et semble donc impliqué dans la résistance au *Bti*.

De plus, une étude de génomique des populations de l'espèce de terrain *Aedes rusticus* traitée depuis 20 ans au *Bti* a permis de mettre en évidence des signatures de sélection liées au traitement et des flux de gènes importants chez cette espèce dans la région Rhône-Alpes.

La caractérisation de la pression de sélection exercée par la rémanence du *Bti* dans les gîtes à moustiques, de facteurs génétiques liés à la résistance (résistance multigénique, fort coût de la résistance, résistance croisée limitée) et de facteurs biologiques liés aux espèces traitées de la région Rhône-alpes (flux de gènes importants) peut aider à la mise en place de stratégies de gestion limitant l'évolution de la résistance au *Bti* dans ces populations.

Mots clés : résistance aux insecticides, *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*, coût de la résistance, scan génomique, transcriptomique, *Aedes*.

Summary :

Mosquito control represents a major public health concern, as mosquitoes transmit many severe human diseases such as malaria, dengue fever, yellow fever and chikungunya. After the massive use of chemical insecticides since the fifties, the bacterio-insecticide *Bacillus thuringiensis* subsp. *israelensis* (*Bti*) represents a safe alternative and is now widely used to control mosquito populations. High toxicity due to commercial *Bti* proliferation and persistence was found in decaying leaf litter collected in mosquito breeding sites.

In order to evaluate the evolution of resistance, an *Aedes aegypti* strain was selected with field-collected leaf litter containing *Bti* toxins in laboratory conditions. Resistance of *Aedes aegypti* to *Bti* Cry toxins evolved after only few generations of larval selection. Several approaches were used to study the genetic bases of *Bti* resistance in the resistant strain. First, the genetic comparison by two genome scans (one with markers linked to transposable elements and one with neutral AFLP markers) of the sensible and the resistant strains revealed genetic loci related to this resistance. Those loci were sequenced and located in the *Ae. aegypti* genome and allowed the detection of several genomic regions under selection. Then, a transcriptome scan allowed the comparison of the transcription of more than 6000 between the susceptible and the resistant strain transcriptome. Several genes potentially involved in *Bti* resistance were detected by combining these results with a candidate gene approach. Among them, a cadherin gene displayed patterns of nucleotide polymorphisms consistent with the action of positive selection and appeared a good candidate for *Bti* resistance.

Furthermore, signatures of selection linked to *Bti* treatment and high gene flow were detected by a population genomic approach in the Rhône-Alpine (France) mosquito strain *Aedes rusticus*.

Information about genetic factors linked to *Bti* resistance (number of genes involved, resistance cost, cross resistance) and biological factors linked to treated species (gene flow) are essential to use adapted resistance management strategies.

Key words : insecticide resistance, *Bacillus thuringiensis* subsp *israelensis*, resistance cost, genome scan, transcriptomic, *Aedes*.